

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/000790

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-270268  
Filing date: 16 September 2004 (16.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

21. 4. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 4 年   9 月 1 6 日  
Date of Application:

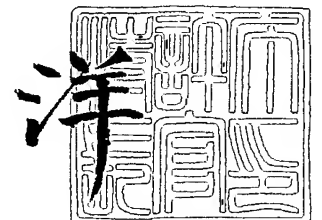
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 4 - 2 7 0 2 6 8  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 4 - 2 7 0 2 6 8 ]

出      願      人                      独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構  
Applicant(s):

2 0 0 5 年   2 月 2 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A181P162  
【提出日】 平成16年 9月16日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12N 15/09  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県倉敷市有城 1 1 6 9 - 1 7 1  
    【氏名】 武田 和義  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岡山県倉敷市有城 1 1 6 9 - 4 0  
    【氏名】 佐藤 和広  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503360115  
    【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代理人】  
    【識別番号】 100080034  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 原 謙三  
    【電話番号】 06-6351-4384  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 003229  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0316432

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

イネ科植物のゲノム DNA 中に存在し、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーであって、

上記赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から 0 ないし 10 センチモルガンの範囲内の距離に位置することを特徴とする遺伝マーカー。

**【請求項 2】**

上記イネ科植物がムギ類であることを特徴とする請求項 1 に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 3】**

上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする請求項 2 に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 4】**

上記ゲノム DNA が 2 H 染色体であることを特徴とする請求項 3 に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 5】**

配列番号 1 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 2 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 6】**

配列番号 3 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 4 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 7】**

配列番号 5 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 6 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 8】**

上記ゲノム DNA が 4 H 染色体であることを特徴とする請求項 3 に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 9】**

イネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 M s e I および E c o R I で消化して得られる DNA 断片に、

配列番号 27 および 28 に示される塩基配列を有する M s e I アダプター、並びに配列番号 29 および 30 に示される塩基配列を有する E c o R I アダプターをライゲーションし、

前記ライゲーション後の DNA 断片を配列番号 31 に示される塩基配列を有する M s e I ユニバーサルプライマーおよび配列番号 32 に示される塩基配列を有する E c o R I ユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、

さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号 7 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 8 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 8 に記載の遺伝マーカー。

**【請求項 10】**

イネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 M s e I および E c o R I で消化して得られる DNA 断片に、

配列番号 27 および 28 に示される塩基配列を有する M s e I アダプター、並びに配列番号 29 および 30 に示される塩基配列を有する E c o R I アダプターをライゲーションし、

前記ライゲーション後の DNA 断片を配列番号 31 に示される塩基配列を有する M s e I ユニバーサルプライマーおよび配列番号 32 に示される塩基配列を有する E c o R I ユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、



さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号 9 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 10 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第五プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 8 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 11】

イネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 M s e I および E c o R I で消化して得られる DNA 断片に、

配列番号 27 および 28 に示される塩基配列を有する M s e I アダプター、並びに配列番号 29 および 30 に示される塩基配列を有する E c o R I アダプターをライゲーションし、

前記ライゲーション後の DNA 断片を配列番号 31 に示される塩基配列を有する M s e I ユニバーサルプライマーおよび配列番号 32 に示される塩基配列を有する E c o R I ユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、

さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号 11 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 12 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第六プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 8 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 12】

オオムギの 4 H 染色体中に存在し、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーであって、

配列番号 13 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 14 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第七プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする遺伝マーカー。

【請求項 13】

配列番号 15 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 16 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第八プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 8 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 14】

配列番号 17 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 18 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第九プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 8 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 15】

上記ゲノム DNA が 5 H 染色体であることを特徴とする請求項 3 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 16】

配列番号 19 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 20 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 15 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 17】

配列番号 21 に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号 22 に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十一プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項 1 または 2 または 3 または 15 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 18】

上記ゲノム DNA が 6 H 染色体であることを特徴とする請求項 3 に記載の遺伝マーカー。

【請求項 19】

イネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 M s e I および E c o R I で消化して得られる DNA 断片に、

配列番号 27 および 28 に示される塩基配列を有する M s e I アダプター、並びに配列番号 29 および 30 に示される塩基配列を有する E c o R I アダプターをライゲーション

し、

前記ライゲーション後のDNA断片を配列番号31に示される塩基配列を有するMse Iユニバーサルプライマーおよび配列番号32に示される塩基配列を有するEcoRIユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、

さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号23に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号24に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十二プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項1または2または3または18に記載の遺伝マーカー。

【請求項20】

配列番号25に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号26に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十三プライマーセットを用いて増幅されることを特徴とする請求項1または2または3または18に記載の遺伝マーカー。

【請求項21】

請求項1ないし20のいずれか1項に記載の遺伝マーカーを用いて赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離する工程を含むことを特徴とするDNA断片の単離方法。

【請求項22】

請求項21に記載の単離方法により得られた上記赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を、イネ科植物のゲノムDNAに導入する工程を含むことを特徴とする赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法。

【請求項23】

上記イネ科植物がムギ類であることを特徴とする請求項22に記載の赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法。

【請求項24】

上記ムギ類がオオムギであることを特徴とする請求項23に記載の赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法。

【請求項25】

請求項22ないし24のいずれか1項に記載の赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法によって得られた赤かび病抵抗性イネ科植物。

【請求項26】

請求項1ないし20のいずれか1項に記載の遺伝マーカーを検出する工程を含むことを特徴とする赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法。

【請求項27】

請求項26に記載の赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法を行なうために用いられる赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キット。

【請求項28】

請求項1ないし20に記載の遺伝マーカーのうち、少なくとも一つ以上が、固定されていることを特徴とする遺伝子検出器具。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】赤かび病抵抗性に連鎖するマーカーおよびその利用

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はムギ類をはじめとするイネ科植物、特にオオムギのゲノムDNA中に存在し、かつ赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー、およびその利用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

オオムギをはじめとするムギ類の「赤かび病」は、オオムギの品質、収穫量を低下させるのみならず、人体にも有害なデオキシニバレノールなどのカビ毒を生じさせる重大な病害であることが知られている。現在、世界中でその感染が増加しているため、赤かび病抵抗性品種の育成が強く望まれている。

## 【0003】

オオムギの赤かび病は、*Fusarium graminearum* (フザリウム・グラミネアルム), *F. roseum* (フザリウム・ロゼウム), *F. culmorum* (フザリウム・クルモルム) 等の一般的にみられる腐生菌が原因となって起こる病害である。当該病原菌は、不完全世代においてイネ科雑草、稲ワラ、麦ワラ、地中の有機物などに腐生的に寄生しているが、温度や日長などの条件が整うと子のう殻を形成する。かかる子のう殻が、水にぬれて膨張・裂開すると子のう胞子が飛散してオオムギ等のムギ類に感染する。ムギ類への感染は、開花期前後の比較的短い期間に起こり、罹病性穂に形成される分生子が第2の感染源となって感染をさらに広げる。また分生子は粘物質を有するため、雨露によって懸濁液となって拡散し、さらに感染を拡大する。オオムギの赤かび病の感染機構は、穎の中に残った葯の残骸や退化した組織を通じて最初の感染が起こり、菌糸が成長して穀粒に侵入するか、あるいは穎よりはみ出した葯を通じて侵入するなど、いずれにせよ葯がその感染に大きく関わっていることがわかっている。

## 【0004】

また、オオムギの中には、赤かび病に対する抵抗性を有する品種が存在している。かかるオオムギの赤かび病抵抗性品種の抵抗性機構について研究がなされ、条性・穂長・出穂時期・穂軸節間長等の形質の関与が示唆されている(例えば、非特許文献1ない5参照)。またオオムギには赤かび病に対する免疫的抵抗性は無いとされ、比較的少数の遺伝子がその抵抗性に関与する量的形質であることがいわれている(例えば非特許文献6参照)。

## 【0005】

ところで、従来、農業作物の優良品種の育種は、目標形質を有する品種や野生種等を交配し、多数の個体を実際に栽培して目標形質を有する個体を選抜し、当該目標形質を遺伝的に固定化しなければならなかった。したがって広大な圃場や多大な人力、相当の年月が必要であった。例えば、赤かび病抵抗性を目標形質とした場合には、選抜対象集団を栽培し、各個体毎に赤かび病抵抗性を評価することにより、選抜すべき個体を特定しなければならなかった。また、目標形質が栽培環境因子に影響を受けやすい形質であれば、選抜個体が発現している目標形質が遺伝子の表現型であるか否かの判定が困難であった。

## 【0006】

そこで、近年は育種期間の短縮、労働力および圃場面積の縮減、有用遺伝子の確実な選抜を図るため、遺伝マーカーを指標とした選抜による育種法が用いられるようになってきた。このような遺伝マーカーによる育種では、マーカーの遺伝子型により幼苗段階で選抜が可能となり、目標形質の有無の確認も容易となる。したがって、遺伝マーカーを利用すれば効率的な育種が実現可能である。そして、遺伝マーカーを利用した育種を実現するためには、目標形質に強く連鎖した遺伝マーカーの開発が必須となる。

## 【0007】

ところで、農業上重要な形質の多くは、雑種後代で連続的な変異を示すものが多い。このような形質は、重さや長さなどの量的な尺度で測定されるので量的形質と呼ばれている

。量的形質は一般に、単一主働遺伝子支配の形質ではなく、複数の遺伝子の作用によって決定されている場合が多い。作物の育種において改良対象とされる形質の多く、例えば収量や品質・食味等はこの量的形質であることが多い。

#### 【0008】

このような量的形質を司る遺伝子が染色体上に占める遺伝的な位置を QTL (Quantitative Trait Loci、量的形質遺伝子座) と称する。QTL を推定する方法として、QTL の近傍に存在する遺伝マーカーを利用する QTL 解析が用いられる。1980 年代後半に遺伝マーカーが登場すると、遺伝マーカー利用による詳細な連鎖地図作成が大きく進み、その地図に基づいて多くの生物で QTL 解析が行われるようになった。

#### 【0009】

以上のように、目標形質に連鎖する遺伝マーカーの開発は、染色体全体をカバーできる詳細な連鎖地図に基づいた精度の高い QTL 解析により可能となり、得られた遺伝マーカーを利用することにより、効率的な育種が実現できるといえる。

#### 【0010】

上記遺伝マーカーに関する技術としては、オオムギを例に挙げると、1) オオムギにアルミニウム耐性を付与する遺伝子に連鎖する遺伝マーカーとその利用に関する技術 (特許文献 1 参照) や、2) オオムギ染色体由来の核酸マーカーをコムギの背景で検出するための新規なプライマーセット (特許文献 2 参照) とその利用に関する技術等が、本発明者らによって提案されている。

【非特許文献 1】Steffen BJ. 1998. "Fusarium head blight of barley: epidemic, impact, and breeding for resistance." NBA Tech Quart 35: 177-184.

【非特許文献 2】Stuchlakova E and Sip V. 1996. "Resistance of Czech and Slovak winter wheat varieties to Fusarium head blight." Genet a Slecht Praha (Genetics and plant Breeding) 32:79-94.

【非特許文献 3】部田 英雄、日浦 運治. 1962. 「赤かび病に対する抵抗性の品種間差異. オオムギの耐病性に関する研究 第 13 報」農学研究 49: 177-187

【非特許文献 4】武田 和義、部田 英雄. 1989. 「オオムギにおける赤かび病検定法の開発と耐病性品種の検索」育種学雑誌 39

【非特許文献 5】Zhu, H., L. Gilchrist, P. Hayes, A. Kleinhofs, D. Kudruna, Z. Liu, L. Porm, B. Steffenson, T. Toojinda, P. Vivar. 1999. "Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium head bright (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploide population of barley." Theor Appl Genet 99: 1221-1232.

【非特許文献 6】堀 真雄. 1985. 「コムギおよびオオムギ赤かび病の発生生態と防除法」農業および園芸 60: 431-436

【特許文献 1】特開 2002-291474 号公報 (2002 (平成 14) 年 10 月 8 日公開)

【特許文献 2】特開 2003-111593 号公報 (2003 (平成 15) 年 4 月 15 日公開)

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

オオムギの赤かび病抵抗性品種の抵抗性機構について研究がなされているが、オオムギの赤かび病抵抗性に関与する遺伝子および抵抗性のメカニズムの詳細についてはいまだ明らかにされていない。

#### 【0012】

そこで本発明は上記課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、オオムギのゲノム DNA 中に存在し、かつ赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーを見いだすことによって、オオムギの赤かび病抵抗性に関与する遺伝子の単離、オオムギ赤か

び病抵抗性のメカニズム解明、赤かび病抵抗性イネ科植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の育種、および赤かび病抵抗性イネ科植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別法等その利用方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者等は、上記課題を解決すべく、赤かび病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種Russia6（二条、抵抗性）とH.E.S. 4（六条、罹病性）の交配から育成した組み換え近交系統（以下、R I 系統という）を材料として、赤かび病抵抗性にかかわるQ T L解析をこれまでにこなってきた。その結果、赤かび病抵抗性に関するQ T Lを2 H染色体上に2つ、5 H染色体上に1つ検出し、当該Q T Lに連鎖する遺伝マーカーを既に見出している。ただし2 H染色体で検出されたQ T Lのうち1つは、公知の条性遺伝子（v r s 1）の位置と一致したことより、v r s 1 遺伝子の多発現の可能性が示唆された。

【0014】

今回は、上記Russia6（二条、抵抗性）とH.E.S. 4（六条、罹病性）の交配から育成したR I 系統（以下、R H I 集団という）に加え、さらにHarbin 2-row（抵抗性）とTurkey 6（罹病性）の交配から育成したR I 系統（以下、R I 2 集団という）およびはるな二条（抵抗性）とH 6 0 2（罹病性）の交配から育成した倍加半数体系統（以下倍加半数対系統の略称をD H、当該系統をD H H S 集団という）を材料として、赤かび病抵抗性にかかわるQ T L解析を行なった。その結果、新たにR H I 集団では2 H、4 H染色体に、R I 2 集団では2 H、4 H、6 H染色体に、D H H S 集団では2 H、4 H、5 H染色体に、それぞれ1つずつのQ T Lを検出した。さらに当該Q T Lに連鎖する遺伝マーカーを見出した。

【0015】

本発明は上記検討に基づき完成されたものである。すなわち本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、イネ科植物のゲノムDNA中に存在し、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーであって、上記赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から0ないし10センチモルガンの範囲内の距離に位置することを特徴としている。

【0016】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、上記イネ科植物がムギ類であってもよい。

【0017】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、上記ムギ類がオオムギであってもよい。

【0018】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、上記ゲノムDNAが2 H染色体であってもよい。

【0019】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号1に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号2に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0020】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号3に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号4に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0021】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号5に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号6に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0022】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、上記ゲノムDNAが4H染色体であることを特徴とするものであってもよい。

【0023】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、イネ科植物のゲノムDNAを制限酵素MseIおよびEcoRIで消化して得られるDNA断片に、配列番号27および28に示される塩基配列を有するMseIアダプター、並びに配列番号29および30に示される塩基配列を有するEcoRIアダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後のDNA断片を配列番号31に示される塩基配列を有するMseIユニバーサルプライマーおよび配列番号32に示される塩基配列を有するEcoRIユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号7に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号8に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0024】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、イネ科植物のゲノムDNAを制限酵素MseIおよびEcoRIで消化して得られるDNA断片に、配列番号27および28に示される塩基配列を有するMseIアダプター、並びに配列番号29および30に示される塩基配列を有するEcoRIアダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後のDNA断片を配列番号31に示される塩基配列を有するMseIユニバーサルプライマーおよび配列番号32に示される塩基配列を有するEcoRIユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号9に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号10に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第五プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0025】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、イネ科植物のゲノムDNAを制限酵素MseIおよびEcoRIで消化して得られるDNA断片に、配列番号27および28に示される塩基配列を有するMseIアダプター、並びに配列番号29および30に示される塩基配列を有するEcoRIアダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後のDNA断片を配列番号31に示される塩基配列を有するMseIユニバーサルプライマーおよび配列番号32に示される塩基配列を有するEcoRIユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号11に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号12に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第六プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0026】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、オオムギの4H染色体中に存在し、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーであって、配列番号13に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号14に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第七プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0027】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号15に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号16に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第八プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0028】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号17に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号18に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第九プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0029】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、上記ゲノムDNAが5H染色体であってもよい。

【0030】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号19に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号20に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0031】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号21に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号22に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十一プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0032】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、上記ゲノムDNAが6H染色体であってもよい。

【0033】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、イネ科植物のゲノムDNAを制限酵素MseIおよびEcoRIで消化して得られるDNA断片に、配列番号27および28に示される塩基配列を有するMseIアダプター、並びに配列番号29および30に示される塩基配列を有するEcoRIアダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後のDNA断片を配列番号31に示される塩基配列を有するMseIユニバーサルプライマーおよび配列番号32に示される塩基配列を有するEcoRIユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を配列番号23に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号24に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十二プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0034】

また本発明にかかる遺伝マーカーは、上記課題を解決するために、配列番号25に示される塩基配列を有するプライマーと、配列番号26に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十三プライマーセットを用いて増幅されるものであってもよい。

【0035】

上記本発明にかかる遺伝マーカーは、イネ科植物、特にムギ類（オオムギ）のゲノムDNA中に存在し、かつ赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖している。つまり当該遺伝マーカーと赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座間で分離して組み換えが起こる確率は低い。それゆえ上記遺伝マーカーを用いることによって、例えば赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の取得、赤かび病抵抗性の有無の判定、赤かび病抵抗性イネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）の判別等を行なうことが可能となる。

【0036】

一方、本発明にかかるDNA断片の単離方法は、上記いずれかの本発明にかかる遺伝マーカーを用いて目的のDNA断片を単離する工程を含んでいる。上記遺伝マーカーは、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖しているため、上記DNAを目標にクローニングを行なえば、目的とするDNA断片を容易に単離することが可能となる。

【0037】

一方、本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法は、上記本発明にかかるDNA断片の単離方法により得られた上記赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を、イネ科植物のゲノムDNAに導入する工程を含むことを特徴としている。

【0038】

また、本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法は、上記イネ科植物がムギ類であってもよい。

【0039】



また、本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法は、上記ムギ類がオオムギであってもよい。

【0040】

上記いずれかの赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法は、上記赤かび病抵抗性に関する遺伝子座を含むDNA断片をイネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNA中に導入する工程を含んでいる。赤かび病抵抗性に関する遺伝子座を含むDNA断片は、赤かび病に対する抵抗性を付与する特性を有するため、赤かび病に対して罹病性のイネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）に抵抗性を付与、または抵抗性を増強することが可能となる。

【0041】

一方、本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物は、上記いずれかの本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法によって得られた赤かび病抵抗性イネ科植物である。

【0042】

上記本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物は、上記赤かび病抵抗性植物の生産方法によって得られた植物（オオムギをはじめとするムギ類）である。それゆえ赤カビによる病害を防止することができ、該植物（オオムギをはじめとするムギ類）の収穫量の向上、品質の向上等を図ることができる。

【0043】

一方、本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法は、上記いずれかの本発明にかかる遺伝マーカーを検出する工程を含むことを特徴としている。

【0044】

上記本発明にかかる遺伝マーカーは、赤かび病抵抗性に関する遺伝子座に連鎖しているものであり、当該遺伝マーカーを検出することによって、試験対象イネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）が赤かび病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）か否かを容易かつ高確率で判別することができる。また上記判定方法は、幼苗段階で判断できるため労力をかけることなく、迅速な判定を行なうことができる。

【0045】

一方、本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キットは、上記赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法を行なうために用いられるものである。

【0046】

上記赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法を行なうために必要な試薬、酵素類をキット化することによって、赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キットを構成することが可能である。よって、当該赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キットによれば、より簡便に赤かび病抵抗性イネ科植物を判定（判別）することができるという効果を奏する。

【0047】

一方、本発明にかかる遺伝子検出器具は、上記の本発明にかかる遺伝マーカーのうち、少なくとも一つ以上が、固定されていることを特徴としている。

【0048】

上記本発明にかかる遺伝子検出器具に対して、試験対象の植物から調製したプローブを反応させ、その時に発するシグナルを検出することで、複数の本発明にかかる遺伝マーカーを容易かつ同時に検出することが可能である。したがって当該遺伝子検出器具は、本発明にかかる遺伝マーカーの多型を検出する手段として用いることができ、例えば赤かび病抵抗性イネ科植物の判定を容易に行うことができるという効果を奏する。

【発明の効果】

【0049】

本発明にかかる赤かび病抵抗性に連鎖する遺伝マーカーによれば、赤かび病抵抗性に関する遺伝子座を含むDNA断片を単離することができる。それゆえ当該DNA断片を用いることによってオオムギの赤かび病抵抗性に関する遺伝子、および赤かび病抵抗性のメカニズム等の解明を行なうことが可能となるという効果を奏する。

【0050】



また本発明にかかる遺伝マーカーは、赤かび病抵抗性に連鎖するため、当該遺伝マーカーを指標として赤かび病抵抗性イネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）の育種を可能とする。したがって、赤かび病抵抗性イネ科植物の効率的な育種が実現できるという効果を奏する。より具体的には、幼苗段階で目的個体を選抜できるため、実際に植物個体の赤かび病抵抗性を評価した後に目的の個体を選抜する必要がなくなり、育種期間を短縮できるという効果を奏する。また、複数の遺伝子座を同時に選抜できるために、観察によって選抜するよりも、確実に目的とする遺伝子型を得ることができる。さらに、労働力および圃場面積を縮減できるという効果を奏する。

#### 【0051】

さらに、本発明にかかる遺伝マーカーを指標として選抜育種を行えば、栽培環境因子による表現型への影響を排除することが可能となる。したがって、有用遺伝子（遺伝子座）の確実な選抜ができるという効果を奏する。

#### 【0052】

また、赤かび病抵抗性を有するイネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）または赤かび病抵抗性がより増強されたイネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）を生産することができる。それゆえ食用作物として重要なイネ科植物（オオムギをはじめとするムギ類）の赤かび病によるオオムギの収穫量の低下、および品質低下等の被害を減少させることが可能となるという効果を奏する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0053】

本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0054】

本発明は、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用の一例に関するものである。以下それぞれについて説明を加える。

#### 【0055】

##### （1）本発明にかかる遺伝マーカー

本発明にかかる遺伝マーカーは、イネ科植物のゲノムDNA中に存在し、赤かび病抵抗性に連鎖しているものであればよい。イネ科植物としてはムギ類であることが好ましく、オオムギであることが特に好ましい。イネ科植物とは、オオムギ属、コムギ属、イネ等の植物であればよく、特に限定されるものではない。また、ムギ類とは、例えばオオムギ、コムギ、ライムギ、ライコムギ、エンバク等を意味する。

#### 【0056】

「赤かび病」とは、前述のとおりフザリウム属菌類がムギ類に感染して起こる病害である。該赤かび病は、登熟不良・減収を引き起こすばかりでなく、カビ毒（例えば、デオキシニバレノール）を生産し、発病したムギを食用・飼料にすると中毒症状を起こすという重大な病害である。

#### 【0057】

オオムギには、かかる赤かび病に対して抵抗性を示す品種が存在している。赤かび病抵抗性の詳細なメカニズムは明らかにされていないが、これまでの研究によって、条性・穂長・出穂時期・穂軸節間長等の形質の関与が示唆されている。またオオムギには赤かび病に対する免疫的抵抗性は無いとされ、比較的少数の遺伝子とその抵抗性に関与する量的形質であることがいわれている。

#### 【0058】

かかる量的形質はQTL解析により、当該量的形質に関与している遺伝子座の染色体上の位置を推定することができる。以下本発明者らがオオムギにおいて開発した赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座と連鎖する遺伝マーカーについて詳細に説明する。なお本発明にかかる遺伝マーカーはこれらに限定されるものではない。

#### 【0059】

発明者等は該赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を検索するため、オオムギの赤かび病

抵抗性に関する Q T L 解析を行なった。具体的には、以下のとおりである。材料としては、Russia6（二条、抵抗性）と H.E.S. 4（六条、罹病性）の交配から育成した R I 系統（R H I 集団）、Harbin 2-row（抵抗性）と Turkey 6（罹病性）の交配から育成した R I 系統（R I 2 集団）、およびはるな二条（抵抗性）と H 6 0 2（罹病性）の交配から育成した R I 系統（D H H S 集団）を用いて行なった。また赤かび病抵抗性の評価方法は、「切り穂検定法」（非特許文献 4 参照）を改変した 0（抵抗性）～10（罹病性）のスコアで評価している。また解析のアルゴリズムには、composite interval mapping（C I M）を用い、解析ソフトウェアにはそれぞれ、MAPMAKER/Q T L と Q T L C a r t o g r a p h e r を用いて行なっている。

#### 【0060】

かかる Q T L 解析の結果、R H I 集団では 2 H、4 H 染色体に、R I 2 集団では 2 H、4 H、6 H 染色体に、D H H S 集団では 2 H、4 H、5 H 染色体に、それぞれ 1 つずつの Q T L を検出した。これら検出した Q T L のうち、R H I 集団から検出された 2 H 染色体上で検出されたものは、本発明者らがこれまでの検討において検出したものと一致するものであった。

#### 【0061】

それぞれの分離集団について発明者らが作成した高密度連鎖地図の情報を元に、上記赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規な遺伝マーカーを見出した。

#### 【0062】

R H I 集団から検出された 4 H 染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「MMtgaEatc128」、「FMgcgEatc530」が挙げられる。

#### 【0063】

「MMtgaEatc128」は、オオムギ等のイネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 M s e I および E c o R I で消化して得られる DNA 断片に、GACGATGAGTCCTGAG（配列番号 27）および TACTCAGGACTCAT（配列番号 28）に示される塩基配列を有する M s e I アダプター、並びに CTCGTAGACTGCGTACC（配列番号 29）および AATTGGTACGCAGTCTAC（配列番号 30）に示される塩基配列を有する E c o R I アダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後の DNA 断片を GATGAGTCCTGAGTAA（配列番号 31）に示される塩基配列を有する M s e I ユニバーサルプライマーおよび GACTGCGTACCAATTC（配列番号 32）に示される塩基配列を有する E c o R I ユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を GATGAGTCCTGAGTAAATC（配列番号 7）に示される塩基配列を有するプライマーと、GACTGCGTACCAATTCCTGA（配列番号 8）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第四プライマーセットを用いて増幅される、いわゆる A F L P（Amplified Fragment Length Polymorphisms）によって検出される遺伝マーカーである。当該遺伝マーカーは、上記 4 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側（5' 末端側）に約 0.1 センチモルガン（以下 c M と表示する）の位置に座乗している。

#### 【0064】

なお上記 A F L P、および以下の説明における A F L P の検出の手順は特に限定されるものではなく、例えば文献（Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Frijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper and Marc Zabeau. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23:21:4407-4414.）の方法またはその改変法に従って行なえばよい。また P C R 等の増幅反応の諸条件は、通常条件で行なうか、あるいは最適な条件を検討の上、適宜採用すればよい。

#### 【0065】

上記第四プライマーセットを用いて最終的に増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Russia6 型）と罹病性型（H.E.S. 4 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Russia6 型）のものが約 128 b p であり、罹病性型（H.E.S. 4 型）のものは 0 b p である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型（Russia6 型）は、約 1

28bpの増幅断片が得られるのに対して、罹病性型(H.E.S. 4型)は約128bpの増幅断片が得られないということである。よって、上記AFLPの検出操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0066】

また「FMgcgEatc530」は、オオムギ等のイネ科植物のゲノムDNAを制限酵素MseIおよびEcoRIで消化して得られるDNA断片に、GACGATGAGTCCTGAG(配列番号27)およびTACTCAGGACTCAT(配列番号28)に示される塩基配列を有するMseIアダプター、並びにCTCGTAGACTGCGTACC(配列番号29)およびAATTGGTACGCAGTCTAC(配列番号30)に示される塩基配列を有するEcoRIアダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後のDNA断片をGATGAGTCCTGAGTAA(配列番号31)に示される塩基配列を有するMseIユニバーサルプライマーおよびGACTGCGTACCAATTC(配列番号32)に示される塩基配列を有するEcoRIユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片をGATGAGTCCTGAGTAAATC(配列番号9)に示される塩基配列を有するプライマーと、GACTGCGTACCAATTCGCG(配列番号10)に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第五プライマーセットを用いて増幅される、いわゆるAFLP(Amplified Fragment Length Polymorphisms)によって検出される遺伝マーカーである。当該遺伝マーカーは、上記4H染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側(3'末端側)に約8.0cMの位置に座乗している。

#### 【0067】

上記第五プライマーセットによって最終的に増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型(Russia6型)と罹病性型(H.E.S. 4型)が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型(Russia6型)のものが0bpであり、罹病性型(H.E.S. 4型)のものは約530bpである。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型(Russia6型)は約530bpの増幅断片が得られないのに対して、罹病性型(H.E.S. 4型)は約530bpの増幅断片が得られるということである。よって、上記AFLPの検出操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0068】

また、RI2集団から検出された2H染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「FXLRRfor\_XLRRrev119」が挙げられる。

#### 【0069】

「FXLRRfor\_XLRRrev119」は、CCGTTGGACAGGAAGGAG(配列番号1)に示される塩基配列を有するプライマー、およびCCCATAGACCGGACTGTT(配列番号2)に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第一プライマーセットを用いて増幅される遺伝マーカー、いわゆるRGA(Resistant Gene Analogs)マーカーであり、上記2H染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約0.2cMの距離に座乗するものである。なお、上記プライマー配列は、イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子Xa21の塩基配列情報(gene bank Accession No:U37133)から設計した。

なお上記RGAマーカーの検出の手順は特に限定されるものではないが、例えば文献(Chen XM, Line RF, Leung H (1998) Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. Theor Appl Genet 98: 345-355)の方法またはその改変法に従って行なえばよい。またPCR等の増幅反応の諸条件は、通常の条件で行なうか、あるいは最適な条件を検討の上、適宜採用すればよい。

#### 【0070】

上記第一プライマーセットによって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型(Harbin 2-row 型)と罹病性型(Turkey 6型)が存在し、それぞれの増幅断片の断片

長は、抵抗性型 (Harbin 2-row 型) のものが 0 b p であり、罹病性型 (Turkey 6 型) のものは約 119 b p である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) は約 119 b p の増幅断片が得られないのに対して、罹病性型 (Turkey 6 型) は約 119 b p の増幅断片が得られるということである。よって、上記操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 2 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0071】

また、R I 2 集団から検出された 4 H 染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「FMacgEcgt288」、「HVM67」が挙げられる。

#### 【0072】

「FMacgEcgt288」は、オオムギ等のイネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 M s e I および E c o R I で消化して得られる DNA 断片に、GACGATGAGTCCTGAG (配列番号 27) および TACTCAGGACTCAT (配列番号 28) に示される塩基配列を有する M s e I アダプター、並びに CTCGTAGACTGCGTACC (配列番号 29) および AATTGGTACGCAGTCTAC (配列番号 30) に示される塩基配列を有する E c o R I アダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後の DNA 断片を GATGAGTCCTGAGTAA (配列番号 31) に示される塩基配列を有する M s e I ユニバーサルプライマーおよび GACTGCGTACCAATTC (配列番号 32) に示される塩基配列を有する E c o R I ユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を GATGAGTCCTGAGTAAACG (配列番号 11) に示される塩基配列を有するプライマーと、GACTGCGTACCAATTCCTG (配列番号 12) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第六プライマーセットを用いて増幅される、いわゆる A F L P (Amplified Fragment Length Polymorphisms) によって検出される遺伝マーカーである。当該遺伝マーカーは、上記 4 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約 0.3 c M の位置に座乗している。

#### 【0073】

上記第六プライマーセットによって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) と罹病性型 (Turkey 6 型) が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型 (Harbin 2-row 型) のものが 0 b p であり、罹病性型 (Turkey 6 型) のものは約 288 b p である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) は約 288 b p の増幅断片が得られないのに対して、罹病性型 (Turkey 6 型) は約 288 b p の増幅断片が得られるということである。よって、上記 A F L P の検出操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 4 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0074】

また「HVM67」は、GTCGGGCTCCATTGCTCT (配列番号 13) に示される塩基配列を有するプライマー、および CCGGTACCCAGTGACGAC (配列番号 14) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第七プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 4 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約 46.8 c M の距離に座乗するものである。当該遺伝マーカーは、いわゆる S S R (Simple Sequence Repeat) マーカーである。

#### 【0075】

「HVM67」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

#### 【0076】

上記第七プライマーセットによって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) と罹病性型 (Turkey 6 型) が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型 (Harbin 2-row 型) のものが 160 b p であり、罹病性型 (Turkey 6 型) のものは約 140 b p である。よって、上記操作によって得られた増幅産物の断片長を電気

泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 4 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0077】

また、RI2 集団から検出された 6 H 染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「FMataEagc408」、「HVM11」が挙げられる。

【0078】

「FMataEagc408」は、オオムギ等のイネ科植物のゲノム DNA を制限酵素 MseI および EcoRI で消化して得られる DNA 断片に、GACGATGAGTCCTGAG (配列番号 27) および TACTCAGGACTCAT (配列番号 28) に示される塩基配列を有する MseI アダプター、並びに CTCGTAGACTGCGTACC (配列番号 29) および AATTGGTACGCAGTCTAC (配列番号 30) に示される塩基配列を有する EcoRI アダプターをライゲーションし、前記ライゲーション後の DNA 断片を GATGAGTCCTGAGTAA (配列番号 31) に示される塩基配列を有する MseI ユニバーサルプライマーおよび GACTGCGTACCAATTC (配列番号 32) に示される塩基配列を有する EcoRI ユニバーサルプライマーを用いて予備増幅を行ない、さらに、前記予備増幅によって得られた予備増幅断片を GATGAGTCCTGAGTAAATA (配列番号 23) に示される塩基配列を有するプライマーと、GACTGCGTACCAATTCAGC (配列番号 24) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十二プライマーセットを用いて増幅される、いわゆる AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) によって検出される遺伝マーカーである。当該遺伝マーカーは、上記 6 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約 4.1 cM の位置に座乗している。

【0079】

上記第十二プライマーセットによって最終的に増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) と罹病性型 (Turkey 6 型) が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型 (Harbin 2-row 型) のものが 0 bp であり、罹病性型 (Turkey 6 型) のものは約 408 bp である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) は約 408 bp の増幅断片が得られないのに対して、罹病性型 (Turkey 6 型) は約 408 bp の増幅断片が得られるということである。よって、上記 AFLP の検出操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 6 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0080】

また「HVM11」は、CCGGTCGGTGCAGAAGAG (配列番号 25) に示される塩基配列を有するプライマーと、AAATGAAAGCTAAATGGCGCATAT (配列番号 26) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十三プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 6 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約 9.4 cM の距離に座乗するものである。当該遺伝マーカーは、いわゆる SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーである。

【0081】

「HVM11」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

【0082】

上記第十三プライマーセットによって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型 (Harbin 2-row 型) と罹病性型 (Turkey 6 型) が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型 (Harbin 2-row 型) のものが 144 bp であり、罹病性型 (Turkey 6 型) のものは約 100 bp - 160 bp に増幅断片が見られる。よって、上記操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 6 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

## 【 0 0 8 3 】

また、D H H S 集団から検出された 2 H 染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「Bmag125」、「k04002」が挙げられる。

## 【 0 0 8 4 】

「Bmag125」は、AATTAGCGAGAACAAAATCAC（配列番号 3）に示される塩基配列を有するプライマー、および AGATAACGATGCACCACC（配列番号 4）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第二プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 2 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約 0 c M の距離に座乗するものである。当該遺伝マーカーは、いわゆる S S R（Simple Sequence Repeat）マーカーである。

## 【 0 0 8 5 】

「Bmag125」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

## 【 0 0 8 6 】

上記第二プライマーセットによって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（はるな二条型）と罹病性型（H 6 0 2 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（はるな二条型）のものが約 1 4 2 b p であり、罹病性型（H 6 0 2 型）のものは約 1 3 4 b p に増幅断片が見られる。よって、上記操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 2 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

## 【 0 0 8 7 】

また「k04002」は、GACACAGGACCTGAAGCACA（配列番号 5）に示される塩基配列を有するプライマー、および CGGCAGGCTCTACTATGAGG（配列番号 6）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第三プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 2 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約 1 0 c M の距離に座乗するものである。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギ E S T 配列の 1 つ（E S T クローン名：ba h32c06、配列番号 4 0、4 1）に基づいて設計されている。なお配列番号 4 0 は、5' 末端側からの塩基配列を示し、配列番号 4 1 は、3' 末端側からの塩基配列を示す。

## 【 0 0 8 8 】

「k04002」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

## 【 0 0 8 9 】

上記第三プライマーセットを用いて増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（はるな二条型）と罹病性型（H 6 0 2 型）が存在し、抵抗性型（はるな二条型）の増幅断片の断片長が約 3 5 0 b p であるのに対し、罹病性型（H 6 0 2 型）のものは約 4 4 0 b p に増幅断片が見られる。よって、上記検出操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 2 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

## 【 0 0 9 0 】

また、D H H S 集団から検出された 4 H 染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「k05042」、「k03289」が挙げられる。

## 【 0 0 9 1 】

「k05042」は、ATACATGCATGCCATTGTGG（配列番号 1 5）に示される塩基配列を有するプライマー、および ATCCATCCACTGTTTGAGGG（配列番号 1 6）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第八プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 4 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約 1 . 2 c M の距離に座乗するものである。上記プライ



マー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギEST配列の1つ（ESTクローン名：basdle04、配列番号33）に基づいて設計されている。

【0092】

「k05042」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

【0093】

また上記第八プライマーセットを用いて増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型と罹病性型が存在し、両者間にSNP（single nucleotide polymorphisms；一塩基多型）がある。図14に両者の増幅産物の塩基配列のうち、上記SNPを含む部分の塩基配列を示した。下が罹病性型（はるな二条型）の塩基配列（配列番号36）であり、上が抵抗性型（H602型）の塩基配列（配列番号37）である。□で囲んだ塩基がSNPである。下線部が制限酵素HapIIの認識配列（CCGG）を示す。図14から明らかのように、抵抗性型の増幅産物は制限酵素HapIIの認識配列（CCGG）を有しているためHapIIで切断されるが、罹病性型の増幅産物は上記認識配列部分のCがAに変異しているため（CAGG）、制限酵素HapIIで切断されない。すなわち、本遺伝マーカーk05042は、CAPS（cleaved amplified polymorphic sequence）マーカーであり、上記第八プライマーセットによる増幅と、増幅産物の制限酵素HapII切断により、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0094】

なお、本遺伝マーカーが連鎖する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座は、赤かび病罹病性型品種であるH602が有する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座である。よって、本遺伝マーカーを検出する場合は、はるな二条型が罹病性型となり、H602型が抵抗性型となる。

【0095】

また「k03289」は、TGCTCTGCATTTTCATTCAGC（配列番号17）に示される塩基配列を有するプライマー、およびCAGCGTTACAGGCATTCTCA（配列番号18）に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第九プライマーセットを用いてオオムギゲノムDNAを鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記4H染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約4.0cMの距離に座乗するものである。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギEST配列の1つ（ESTクローン名：bags3h19、配列番号34）に基づいて設計されている。

【0096】

「k03289」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

【0097】

また上記第九プライマーセットを用いて増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型と罹病性型が存在し、両者間にSNP（single nucleotide polymorphisms；一塩基多型）がある。図15に両者の増幅産物の塩基配列のうち、上記SNPを含む部分の塩基配列を示した。下が罹病性型（はるな二条型）の塩基配列（配列番号38）であり、上が抵抗性型（H602）の塩基配列（配列番号39）である。□で囲んだ塩基がSNPである。下線部が制限酵素SacIIの認識配列（CCGCGG）を示す。図15から明らかのように、罹病性の増幅産物は制限酵素SacIIの認識配列（CCGCGG）を有しているためSacIIで切断されるが、抵抗性型の増幅産物は上記認識配列部分のCがTに変異しているため（CCGTGG）、制限酵素SacIIで切断されない。すなわち、本遺伝マーカーk03289は、CAPSマーカーであり、上記第九プライマーセットによる増幅と、増幅産物の制限酵素SacII切断により、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0098】

なお、本遺伝マーカーが連鎖する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座は、赤かび病罹病性型品種である H 6 0 2 が有する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座である。よって、本遺伝マーカーを検出する場合は、はるな二条型が罹病性型となり、H 6 0 2 型が抵抗性型となる。

#### 【0099】

また、D H H S 集団から検出された 5 H 染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する新規遺伝マーカーとしては、「HvLOX」、「k00835」が挙げられる。

#### 【0100】

「HvLOX」は、CAGCATATCCATCTGATCTG (配列番号 19) に示される塩基配列を有するプライマー、および CACCCTTATTTATTGCCTTAA (配列番号 20) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 5 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約 0.5 cM の距離に座乗するものである。当該遺伝マーカーは、いわゆる S S R (Simple Sequence Repeat) マーカーである。

#### 【0101】

「HvLOX」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

#### 【0102】

上記第十プライマーセットを用いて増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型 (はるな二条型) と罹病性型 (H 6 0 2 型) が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型 (はるな二条型) のものが約 155 bp であり、罹病性型 (H 6 0 2 型) のものは約 157 bp である。よって、上記操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 5 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0103】

また「k00835」は、TCCATGTTCCCAGCTACACA (配列番号 21) に示される塩基配列を有するプライマー、および AGGAACACATTGGTTCTGGC (配列番号 22) に示される塩基配列を有するプライマーとの組み合わせである第十一プライマーセットを用いてオオムギゲノム DNA を鋳型として増幅される遺伝マーカーであり、上記 5 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から長腕側に約 1.9 cM の距離に座乗するものである。上記プライマー配列は、発明者らが独自に開発したオオムギ EST 配列の 1 つ (EST クローン名: baak46e06、配列番号 35) に基づいて設計されている。

#### 【0104】

「k00835」の増幅方法は特に限定されるものではなく、適宜最適な条件を検討の上、採用すればよい。

#### 【0105】

上記第十一プライマーセットを用いて増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型 (はるな二条型) と罹病性型 (H 6 0 2 型) が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型 (はるな二条型) のものが約 900 bp であり、罹病性型 (H 6 0 2 型) のものは約 880 bp である。よって、上記操作によって得られた増幅産物の断片長を電気泳動等の公知の手段を用いて確認することにより、対象植物個体が当該 5 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0106】

ここで、モルガン (M) について説明する。1 モルガン (M) とは、減数分裂 1 回あたり平均 1 回の交叉を起こす染色体上の距離の単位である。例えば、2.2 cM は、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座と遺伝マーカーとの間で染色分体あたり平均して 1000 分の 22 回組み換えが起こることを示している。すなわちこの時は、2.2% の組み換え率であることを示している。



## 【0107】

ところで、増幅に際して鋳型として用いられるゲノムDNAは、オオムギの植物体より従来公知の方法で抽出可能である。具体的には、植物体からゲノムDNAを抽出するための一般法 (Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Nucleic Acids Res. 8:4321-4325. など参照) が好適な例として挙げられる。また、上記のゲノムDNAは、根、茎、葉、生殖器官など、オオムギの植物体を構成するいずれの組織を用いても抽出可能である。また、場合によってはオオムギのカルスから抽出してもよい。なお、上記生殖器官には、花器官 (雄性・雌性生殖器官を含む) や種子も含まれる。ゲノムDNAの抽出は、例えば、オオムギの芽生え期の葉を用いて行われる。この理由としては、組織の摩砕が比較的容易であり、多糖類などの不純物の混合割合が比較的少なく、また、種子から短期間で育成可能である点が挙げられる。

## 【0108】

またオオムギのゲノムDNAを鋳型とし、上記プライマーの組み合わせを用いて増幅する方法は、従来公知のDNA増幅法を採用することができる。一般には、PCR法 (ポリメラーゼ連鎖反応法) や、その改変法が用いられる。PCR法や、その改変法を用いる際の反応条件は特に限定されるものではなく、通常と同様の条件下で増幅することができる。

## 【0109】

本発明にかかる遺伝マーカーを用いることによって、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を単離することが可能となり、上記DNA断片を用いることによって、オオムギの赤かび病抵抗性に関与する遺伝子、および赤かび病抵抗性のメカニズムの解明に利用が可能である。また上記DNA断片をイネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) のゲノムDNAの導入することによって赤かび病抵抗性イネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) を生産 (育種) することが可能となる。

## 【0110】

また上記遺伝マーカーは、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖しているため、試験対象であるイネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) のゲノムDNA中における該遺伝マーカーの多型を検出することによって、該イネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) が赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を有するか否かを判定することが可能となる。また同様に赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖しているため、試験対象であるイネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) のゲノムDNA中における該遺伝マーカーの多型を検出することによって、該イネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) が、赤かび病抵抗性イネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) であるか否かを判別することができる。また、上記遺伝マーカーを増幅することができるプライマーまたは、上記遺伝マーカーを固定したDNAマイクロアレイをキット化すれば、イネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の有無判定キット、および赤かび病抵抗性イネ科植物 (例えばオオムギをはじめとするムギ類) の判定キットを提供することが可能となる。

## 【0111】

上述のごとく、本発明にかかる遺伝マーカーは、様々な用途に利用が可能であることは明らかである。上述した本発明にかかる遺伝マーカーの用途の一例については、後に詳細に説示する。

## 【0112】

(2) 本発明にかかる遺伝マーカーの利用

＜赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の単離方法＞

上述のとおり本発明にかかる遺伝マーカー、「FXLRRfor\_XLRRrev119」、「Bmag125」、「k04002」はオオムギ2H染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖するものであり、「MMtgaEatc128」、「FMgcgEatc530」、「FMacgEcgt288」、「HVM67」、「k05042」、「k03289」はオオムギ4H染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖するものであり、「HvLOX」、「k00835」はオオムギ5H染色体上に

検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖するものであり、「FMataEagc408」、「HVM11」はオオムギ 6 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖するものである。

#### 【0113】

よって、「FXLRRfor\_XLRRrev119」、「Bmag125」、「k04002」の遺伝マーカーを用いることによってオオムギ 2 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離することができ、「MMtgaEatc128」、「FMgcgEatc530」、「FMacgEcgt288」、「HVM67」、「k05042」、「k03289」の遺伝マーカーを用いることによってオオムギ 4 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離することができ、「HvLOX」、「k00835」の遺伝マーカーを用いることによってオオムギ 5 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離することができ、「FMataEagc408」、「HVM11」の遺伝マーカーを用いることによってオオムギ 6 H 染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離することができる。

#### 【0114】

単離とは、目的の DNA 断片、すなわち赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片をクローニングすることを意味することはいうまでもないが、広義には交雑 F1 集団から戻し交配等により、両親のうち一方の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を有する個体を選抜し、その遺伝子座領域のみを目的品種に導入する同質遺伝子系統の作製も単離に含まれる。

#### 【0115】

本発明にかかる遺伝マーカーを用いて赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離する方法としては特に限定されるものではないが、例えば次のような方法を挙げることができる。

#### 【0116】

オオムギでは本発明者らが開発を進めている「はるな二条」を含めて、ゲノム DNA の BAC ライブラリーが 2 種類作成されており、現在複数の BAC ライブラリーが開発中である。そこで、このような BAC ライブラリーを用いて、従来公知のマッピングクローニングの手法にしたがって、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座と当該遺伝子座に連鎖する本発明の遺伝マーカーとで当該マーカーを含む BAC クローンを同定し、そこから BAC のコンティグを作成して塩基配列を確定することにより、最終的に赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に到達することができる。

#### 【0117】

また、上述のように、交雑 F1 に一方の親を戻し交配することにより、他方の親の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を目的品種に導入して（広義の）単離をすることができる。

#### 【0118】

なお、上記方法をはじめとする赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片を単離する際には、目的とする赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に対してなるべく近傍に座乗する遺伝マーカーを選択して用いることが好ましい。目的とする赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座と遺伝マーカーの間で組み換えが起こる確率がより低くなり、より確実に赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む断片を単離することができるからである。

#### 【0119】

＜赤かび病抵抗性イネ科植物の生産方法、および当該生産方法によって得られた赤かび病抵抗性イネ科植物＞

上記本発明にかかる赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片の単離方法によって得られた赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む DNA 断片をイネ科植物のゲノム DNA に導入することによって、赤かび病抵抗性イネ科植物を生産することが可能である。イネ科植物としてはムギ類であることが好ましく、オオムギであることが特に好ましい。また、例えば、オオムギから単離された赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含む D

NA断片をオオムギ以外のイネ科植物に導入することも可能であり、同一属間のみでの単離、導入に限定されるものではない。

#### 【0120】

上記DNA断片を導入する方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を適宜選択して用いることができる。より具体的には、例えばアグロバクテリウムまたはパーティクルガンを用いてイネ科植物のゲノムDNAに導入することによって生産すればよく、これにより、赤かび病抵抗性品種が得られることとなる。例えば、雑誌The Plant Journal(1997) 11(6), 1369-1376 には、Sonia Tingay等により、Agrobacterium tumefaciens を用いてオオムギを形質転換する方法が開示されており、この方法を利用して形質転換オオムギを生産可能である。

#### 【0121】

また、目的とする赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を有する植物個体と、当該DNA断片を導入しようとする植物個体との交雑により、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片を、植物に導入することも可能である。この方法では、交雑が可能である限りにおいて、他の種や属の植物が有する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片の導入が可能である。

#### 【0122】

本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物は、上記本発明にかかる生産方法により得られるものである。当該赤かび病抵抗性イネ科植物は、赤かび病抵抗性の表現型（赤かび病抵抗性型）を有する遺伝子座を含むDNA断片を導入した場合には、元の品種の赤かび病抵抗性より高い品種となり、赤かび病罹病性の表現型（赤かび病罹病性型）を有する遺伝子座を含むDNA断片を導入した場合には、元の品種の赤かび病抵抗性より弱い品種となる。よって、赤かび病抵抗性型を有する遺伝子座を含むDNA断片を導入することが好ましい。

#### 【0123】

また、植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）に導入する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片は、2H染色体上のDNA断片、4H染色体上のDNA断片、5H染色体上のDNA断片、6H染色体上のDNA断片の内、いずれのDNA断片であっても赤かび病抵抗性イネ科植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）を生産することは可能であるが、複数のDNA断片を同一のイネ科植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のゲノムDNAに導入されることによって、さらに赤かび病抵抗性が向上したイネ科植物を生産することが可能である。

#### 【0124】

本発明者等は、条性遺伝子vrs1の遺伝子座と一致した赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片（以下、vrs1断片という。）を、2H染色体上のDNA断片または5H染色体上のDNA断片をそれぞれ単独導入したオオムギに導入することによって赤かび病抵抗性が単独導入の場合に比して向上することを確かめている。さらには、上記vrs1断片を、2H染色体上のDNA断片および5H染色体上のDNA断片を両方導入したオオムギに導入すると、さらに赤かび病抵抗性が向上することを確かめている。

#### 【0125】

上記方法によって得られた本発明にかかる赤かび病抵抗性オオムギをはじめとする赤かび病抵抗性イネ科植物によれば、これまで赤かび病によって品質・収穫量の低下、赤かび病に感染した植物を食することによる人体・家畜への危害を効果的に回避することが可能となり、農業・畜産業等に極めて有効である。また食糧難の問題も改善することができる。

#### 【0126】

なお上記「赤かび病抵抗性イネ科植物」および「赤かび病抵抗性オオムギ」とは、赤かび病に対して全く抵抗性を有していなかったイネ科植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）に赤かび病の抵抗性を付与することによって生産されたイネ科植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）、および元来赤かび病に抵抗性を有するイネ科植物（例えば

オオムギをはじめとするムギ類)に赤かび病抵抗性をさらに増強させることによって生産されたイネ科植物(例えばオオムギをはじめとするムギ類)を含む意味である。

#### 【0127】

＜赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法＞

本発明にかかる赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法(選抜方法)は、上記本発明にかかる遺伝マーカーを検出する工程を含む方法であればよく、その他の工程、条件、材料等は特に限定されるものではない。例えば、従来公知の作物育種法を利用することができる。

#### 【0128】

より具体的には、例えば、交配等により作出した植物のゲノムDNAを抽出し、本発明に係る遺伝マーカーの遺伝子型を指標として植物を判定(選抜)する方法が挙げられる。遺伝マーカーを検出する手段としては、例えば、対象とする植物から抽出したゲノムDNAを鋳型として上記第一ないし第十三プライマーセットのいずれかを用いて増幅したDNA断片について、断片長または断片の制限酵素消化パターンの観察を挙げることができる。増幅断片から試験対象植物個体が、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを、各遺伝マーカーを指標として判定する方法については、上記本発明にかかる遺伝マーカーの項で説明したとおりである。

#### 【0129】

ここで本判定方法の判定の精度(確率)については、以下のとおりである。赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から1.2cMの距離に位置する遺伝マーカーは、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座と遺伝マーカーとの間で染色分体あたり平均して1000分の12回組み換えが起こる。すなわち1.2%の確率で組み換えが起こる。よってこの遺伝マーカーのうち赤かび病抵抗性型のものを検出すれば、98.8%の確率で赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を有しているということがいえる。よって赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座と遺伝マーカーとの距離が近いほど、高確率をもって赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の有無を判定することができる、すなわち赤かび病抵抗性イネ科植物を判定(選抜)することができるといえる。

#### 【0130】

上記理由により、多型を検出する遺伝マーカーは、上記遺伝マーカーのいずれであっても赤かび病抵抗性の有無を判定することが可能であるが、各赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に対してなるべく近傍に座乗する遺伝マーカーを検出することが好ましい。例えば、本判定方法において4H染色体上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーを検出する場合は、「k05042」(赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座からの距離:約1.2cM)の方が「k03289」(赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座からの距離:約4.0cM)より好適であるといえる。

#### 【0131】

また本検出方法においては、複数の遺伝マーカーの多型を検出してもよい。特に判定の精度(確率)を向上させるためには、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を挟む関係にある遺伝マーカーを選択して多型を検出すればよい。例えば、「k05042」(赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約1.2cM)と「k03289」(赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座からの距離:約4.0cM)との組み合わせが有る。かかる組み合わせを例にして、該遺伝マーカーをそれぞれ単独で多型を検出した場合と、両方の多型を検出した場合とにおける本判定方法の精度(確率)についてより具体的に説明する。

#### 【0132】

「k05042」は赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座から短腕側に約1.2cMの位置に座乗しており、該遺伝マーカーの多型を単独で検出したときの本判定方法の精度(確率)は、 $(1 - 12 \div 1000) \times 100 = \text{約} 98.8\%$ である。一方「k03289」は赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座からの距離:約4.0cMの位置に座乗しており、該遺伝マーカーの多型を単独で多型を検出したときの本判定方法の精度(確率)を同様に計算すると

96.0%である。当該2つの遺伝マーカーの多型を両方検出すると、 $(1 - (12 \div 1000)) \times (40 \div 1000) \times 100 = 99.952\%$ となり高確率を持って4H上の赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の有無を判定することができる。

#### 【0133】

したがって赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を挟む関係にある遺伝マーカーを検出して判定することは好ましい。上記「k05042」と「k03289」以外の組み合わせとしては、「MMtgaEatc128」と「FMgcgEatc530」との組み合わせ、「FMacgEcgt288」と「HVM67」との組み合わせ、「FMataEagc408」と「HVM11」との組み合わせ、「Bmag125」と「k04002」との組み合わせ、「HvLOX」と「k00835」との組み合わせ等が挙げられる。

#### 【0134】

なお本判別方法は、赤かび病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の育種の際の有効なスクリーニング手段として利用することができる。例えば、上記本発明にかかる赤かび病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の生産方法を行なった際に、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を含むDNA断片が導入された形質転換体植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）を多数の形質転換体候補から容易にスクリーニングすることができる。その他薬剤等の変異処理、交配などの育種処理を行なった植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）のスクリーニング手段としても利用可能である。

#### 【0135】

<赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キット>

また上記「赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法」を行なうために必要な試薬、酵素類をキット化することによって、赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キット（以下適宜「判定キット」と称する）を構成することが可能である。上記「赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法」の項で説示したごとく、本発明にかかる遺伝マーカーを利用することによって、試験対象イネ科植物個体が、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判定することができる。すなわち、試験イネ科対象植物個体が赤かび病抵抗性か罹病性であるかを判断することができるということである。よって、当該判定キットによれば、より簡便に赤かび病抵抗性イネ科植物を判別できるという効果を奏する。

#### 【0136】

なお当該判定キットには、少なくとも本発明にかかる遺伝マーカーを検出することができる、プライマーセット（第一から第十三プライマーセット）が少なくとも一つ以上含まれていることが好ましい。さらに好ましくは、上記プライマーセット（第一から第十三プライマーセット）全てが含まれていることが好ましい。この他、公知の赤かび病抵抗性に連鎖するマーカーを検出するために必要なプライマーが含まれていてもよい。

#### 【0137】

さらには当該判定キットには、PCRを行なうための酵素、試薬類が含まれていてもよいし、鋳型となるゲノムDNAの調製するために必要な試薬、バッファー類、遠心チューブが含まれていてもよいし、目的のDNAサイズバンドの検出に必要な遺伝マーカー（MMtgaEatc128、FMgcgEatc530、FXLRRfor\_XLRRrev119、FMacgEcgt288、HVM67、FMataEagc408、HVM11、Bmag125、k04002、k05042、k03289、HvLOX、k00835）または適当なDNAサイズマーカーが含まれていてもよい。

#### 【0138】

<遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）>

本発明にかかる遺伝マーカー（MMtgaEatc128、FMgcgEatc530、FXLRRfor\_XLRRrev119、FMacgEcgt288、HVM67、FMataEagc408、HVM11、Bmag125、k04002、k05042、k03289、HvLOX、k00835）を適当な基板（ガラス、シリコンウエハ、ナイロンメンブレン等）上に固定することによって、DNAマイクロアレイを始めとする遺伝子検出器具を構成することができる。当該遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）に対して、試験対象の植物から調製したプローブを反応させ、その時に発するシグナルを検出することで、複数の本発明にか

かる遺伝マーカーを容易かつ同時に検出することが可能である。したがって当該遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）は、本発明にかかる遺伝マーカーの多型を検出する手段として用いることができる。よって、上記赤かび病抵抗性イネ科植物の判定方法における検出手段として利用可能である。また、当該DNAマイクロアレイを上記赤かび病抵抗性イネ科植物の判定キットに加えることもできる。この場合、当該キットには遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）からのシグナルを検出するために用いる試薬・器具・装置等が含まれていてもよい。

#### 【0139】

本遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）の基板上には、本発明にかかる遺伝マーカー（MMtgaEatc128、FMgcgEatc530、FXLRRfor\_XLRRrev119、FMacgEcgt288、HVM67、FMataEagc408、HVM11、Bmag125、k04002、k05042、k03289、HvLOX、k00835）のうち少なくとも1つ以上の遺伝マーカーが固定されていればよい。また抵抗性型の遺伝マーカー、罹病性型の遺伝マーカーのいずれか一方もしくは両方が固定されてもよい。さらにより高精度（確率）をもって赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の有無を判断するためには、赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を挟む関係にある複数の遺伝マーカーの組み合わせが固定されていることが好ましい。かかる遺伝マーカーの組み合わせとしては、「k05042」と「k03289」の組み合わせ、「MMtgaEatc128」と「FMgcgEatc530」との組み合わせ、「FMacgEcgt288」と「HVM67」との組み合わせ、「FMataEagc408」と「HVM11」との組み合わせ、「Bmag125」と「k04002」との組み合わせ、「HvLOX」と「k00835」との組み合わせ等が挙げられる。全ての遺伝マーカー（抵抗性型および罹病性型）が固定されている事が最も好ましいことはいうまでもない。

#### 【0140】

上記複数の遺伝マーカーが固定された遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）を用いることによって、一度の試行で複数の遺伝マーカーを簡便に検出することができる。さらに赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の有無の判断を高い精度（確率）をもって行なうことができる。

#### 【0141】

なお、上記遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）には、本発明にかかる遺伝マーカーのみならずその近傍に位置するその他の遺伝マーカーが固定されていてもよい。

#### 【0142】

さらに上記遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）には、本発明にかかる遺伝マーカーがオオムギの染色体上に並んでいる順序で固定されているか、あるいはオオムギの染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されて固定されていることが好ましい。試験対象がオオムギである際に検出の精度をさらに向上させることが可能となるからである。つまり、従来のDNAマイクロアレイを用いた解析において、あるスポットに対するシグナルが得られなかった場合、本当に検出しようとする遺伝マーカーが存在しないのか、または解析の実験上のミスによりシグナルが得られていないのかについては、改めて確認しなければ正確には判定することはできなかった。これに対して、上記のごとく遺伝マーカーがオオムギの染色体上に並んでいる順序で固定されているか、あるいはオオムギの染色体上に並んでいる順序に対応する配列位置情報が付与されて固定されている遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）を用いる場合においては、固定化されている遺伝マーカーの染色体上の順序が確認できるように配列されているため、上記のような実験上でのミスか否かを容易に判定することが可能となる。

#### 【0143】

具体的には、例えば、シグナルが得られなかったスポットの前後のスポットでシグナルが得られたとする。当該遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）では、各スポットは、染色体上に並んでいる順序が確認できるように配列されている。通常、染色体上に直線上に近接して並んでいる遺伝子のうち一つの遺伝子のみが組み換わるためには2つの組み換えがごく近傍で起こらなくてはならない。このような現象が起こる確率が極めて低いため、シグナルが得られなかったという結果は、実験上のミスによるものであると判断される



。このように、当該遺伝子検出器具（DNAマイクロアレイ）では、あるスポットに対するシグナルが得られなかった場合でも、実験上でのミスか否かを容易に判定することが可能となるため、解析の精度を向上することができる。

#### 【0144】

なお本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

#### 【0145】

また本発明の説明において使用したプライマー等の配列は、本発明にかかる遺伝マーカーを増幅することができるものであれば、1または数個の塩基が置換、欠失、付加がされた塩基配列を有するプライマーを用いてもよい。

#### 【実施例】

#### 【0146】

〔実施例1：オオムギの赤かび病抵抗性に関するQTL解析〕

オオムギの赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座を検索するためにQTL解析を行なった。

#### 【0147】

##### <材料>

赤かび病に対する抵抗性が異なるオオムギ品種Russia 6（二条、抵抗性）とH.E.S. 4（六条、罹病性）の交配から育成したR I系統（R H I集団）、Harbin 2-row（抵抗性）とTurkey 6（罹病性）の交配から育成したR I系統（R I 2集団）、およびはるな二条（抵抗性）とH 6 0 2（罹病性）の交配から育成したR I系統（D H H S集団）を用いた。

#### 【0148】

##### <赤かび病抵抗性の評価方法>

「切り穂検定法」（非特許文献4参照）の改変法で評価した。簡単には以下のとおりに行なった。

#### 【0149】

材料を慣行法で栽培し、それぞれの系統の開花期に止葉をつけて上から2番目の節間で穂を切り取ったものに対し、水道水をかけ流しにしたステンレス製のバットに立てた。これに対して、赤かび病菌の分生子が顕微鏡200倍視野当たり15個程度になるように調整した懸濁液を十分に噴霧した。分生子接種後2日間は25℃・湿度100%の条件下、その後の6日間は18℃・湿度90%前後の人工気象室にて栽培した。光条件は日長14時間・照度約10、000 luxとした。分生子接種後8日目に肉眼で観察して黄褐色に変色した穎花を罹病粒として罹病性小穂歩合を調査し、表1に示す基準に従って0（抵抗性）～10（罹病性）のスコアで評価している。

#### 【0150】

##### 【表1】

スコア	0	2	4	6	8	10
罹病性歩合(%)	0	1～5	6～20	21～40	41～60	61～100

#### 【0151】

またQTL解析のアルゴリズムには、composite interval mapping（CIM）を用い、解析ソフトウェアにはそれぞれ、MAPMAKER/QTLとQTL Cartographerを用いて行なった。LODスコアの閾値を2に設定し、LODスコアが2を超えた場合に当該2つのマーカー区間の最もLODの大きな位置にQTLの存在を推定した。

#### 【0152】

##### <結果>

R H I集団の結果を表2に、R I 2集団の結果を表3に、D H H S集団の結果を表4に

示した。

【0153】

【表2】

Chromo- some	Marker interval (M1-A-QTL-B-M2)	Distance (cM)A+B	Position <sup>a)</sup> (cM)A	Position (cM)B	LOD <sup>b)</sup> score	Var. <sup>c)</sup> (%)	Weight <sup>d)</sup>
2H	MEgacMacc314-FEgtaMacg677	0.6	0.0	0.6	5.0	23.7	-1.5
4H	MMtgaEatc128-FMgcgEatc530	8.1	0.1	8.0	2.7	12.4	-1.1

a): Distance of peak LOD score position from the left side marker

b): Peak LOD score of significant marker interval

c): Explained variance of peak LOD score

d): Estimated additive effect

【0154】

表2から明らかなように、RHI集団において、赤かび病抵抗性に関与するQTLを2H染色体上に1つ、4H染色体上に1つ検出した。このうち2H染色体上に検出された赤かび病抵抗性に関与するQTLは、発明者らのこれまでの検討により既に検出したものであった。したがって、今回の検討によって、新たに4H染色体上に1つ赤かび病抵抗性に関与するQTLを発見したことになる。

【0155】

上記QTLは、遺伝マーカーMMtgaEatc128から0.0cMの距離、遺伝マーカーFMgcgEatc530から短腕側に8.0cMの距離で、両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、LODスコアは2.7である。このQTLで表現型の分散の12.4%を説明できる。また、このQTLの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが1.1下がる（すなわち抵抗性が上がる）。

【0156】

【表3】

Chromo- some	Marker interval (M1-A-QTL-B-M2)	Distance (cM)A+B	Position <sup>a)</sup> (cM)A	Position (cM)B	LOD <sup>b)</sup> score	Var. <sup>c)</sup> (%)	Weight <sup>d)</sup>
2H	FXLRRfor_XLRRrev119 -FEgtaMacg677	3.5	0.2	3.3	2.6	10.1	-1.3
4H	FMacgEcgt288-HVM67	47.1	0.3	46.8	2.2	25.5	-0.9
6H	FMataEagc408-HVM11	13.5	4.1	9.4	2.7	28.6	-1.0

a): Distance of peak LOD score position from the left side marker

b): Peak LOD score of significant marker interval

c): Explained variance of peak LOD score

d): Estimated additive effect

【0157】

RI2集団については2回QTL解析を行っており、1回目のQTL解析では、赤かび病抵抗性に関与するQTLを2H染色体上に1つ検出した。また2回目のQTL解析により、4H染色体上に1つ、6H染色体上に1つ検出した。

【0158】

上記2H染色体上に検出したQTLは、遺伝マーカーFXLRRfor\_XLRRrev119から長腕側に0.2cMの距離で、遺伝マーカーFegtaMacg677から短腕側に3.3cMの距離で両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、LODスコアは2.6である。このQTLで表現型の分散の10.1%を説明できる。また、このQTLの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが1.3下がる（すなわち抵抗性が上がる）。

【0159】

また上記4H染色体上に検出したQTLは、遺伝マーカーFMacgEcgt288から長腕側に0



・ 3 c Mの距離で、遺伝マーカーHVM67から短腕側に46.8 c Mの距離で両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、L O Dスコアは2.2である。このQ T Lで表現型の分散の25.5%を説明できる。また、このQ T Lの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが0.9下がる（すなわち抵抗性が上がる）。

#### 【0160】

また上記6 H染色体上に検出したQ T Lは、遺伝マーカーFMataEagc408から長腕側に4.1 c Mの距離で、遺伝マーカーHVM11から短腕側に9.4 c Mの距離で両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、L O Dスコア2.7である。このQ T Lで表現型の分散の28.6%を説明できる。また、このQ T Lの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが1.0下がる（すなわち抵抗性が上がる）。

#### 【0161】

##### 【表4】

Chromosome	Marker interval (M1-A-QTL-B-M2)	Distance (cM)A+B	Position <sup>a)</sup> (cM)A	Position (cM)B	LOD <sup>b)</sup> score	Var. <sup>c)</sup> (%)	Weight <sup>d)</sup>
2H	Bmag125-k04002	10.0	0.0	10.0	2.0	12.2	-2.2
4H	k05042-k03289	5.2	1.2	4.0	3.2	27.7	2.8
5H	HvLOX-k00835	2.4	0.5	1.9	3.1	19.7	-2.4

a): Distance of peak LOD score position from the left side marker

b): Peak LOD score of significant marker interval

c): Explained variance of peak LOD score

d): Estimated additive effect

#### 【0162】

表4から明らかなように、D H H S集団においては、赤かび病抵抗性に関与するQ T Lを2 H染色体上に1つ、4 H染色体上に1つ、5 H染色体上に1つ検出した。

#### 【0163】

上記2 H染色体上に検出したQ T Lは、遺伝マーカーBmag125から0.0 c Mの距離で、遺伝マーカーk04002から短腕側に10.0 c Mの距離で両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、L O Dスコアは2.0である。このQ T Lで表現型の分散の12.2%を説明できる。また、このQ T Lの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが2.2下がる（すなわち抵抗性が上がる）。

#### 【0164】

また上記4 H染色体上に検出したQ T Lは、遺伝マーカーk05042から長腕側に1.2 c Mの距離で、遺伝マーカーk03289から短腕側に4.0 c Mの距離で両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、L O Dスコアは3.2である。このQ T Lで表現型の分散の27.7%を説明できる。また、このQ T Lの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが2.8上がる（すなわち抵抗性が下がる）。

#### 【0165】

また上記5 H染色体上に検出したQ T Lは、遺伝マーカーHvLoxから長腕側に0.5 c Mの距離で、遺伝マーカーk00835から短腕側に1.9 c Mの距離で両遺伝マーカーに挟まれる位置に座乗しており、L O Dスコア3.1である。このQ T Lで表現型の分散の19.7%を説明できる。また、このQ T Lの存在で上記「切り穂検定法」のスコアが2.4下がる（すなわち抵抗性が上がる）。

#### 【0166】

【実施例2：遺伝マーカー「MMtgaEatc128」の検出】

（方法）

50 ngの試験対象オオムギのゲノムDNAを各1.5 UのE c o R I（タカラバイオ社製）およびM s e I（NEW ENGLAND BioLabs社製）により、合計25 μlの反応系において37℃で12時間ダブルダイジェストを行なった。制限酵素処理後のDNAに5 μM E c o R Iアダプター（塩基配列は配列番号29および配列番号30に示す）と50 μM M

seI アダプター（塩基配列は配列番号 27 および配列番号 28 に示す）を 25 U の T4 ligase（タカラバイオ社製）によって 37℃、3 時間ライゲーションを行なった。上記ライゲーション後の DNA 断片を EcoRI のユニバーサルプライマー（塩基配列は配列番号 32 に示す）と MseI のユニバーサルプライマー（塩基配列は配列番号 31 に示す）を用いてプレアンプリフィケーション（予備増幅）を行なった。0.07 mg/ml プレアンプリフィケーションの反応溶液について、配列番号 8 に示される塩基配列を有する EcoRI のセレクトティブプライマー、および配列番号 7 に示される塩基配列を有する MseI のセレクトティブプライマーを用いて増幅反応（本増幅）を行なった。なお増殖反応には、TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ社製）を用いた。

#### 【0167】

上記予備増幅の反応サイクルは、94℃2 分間の後、94℃30 秒間→56℃1 分間→72℃1 分間の工程を 20 回行なった。

#### 【0168】

また本増幅の反応サイクルは、94℃30 秒間→68℃30 秒間→72℃1 分間の後、94℃30 秒間→68℃30 秒間→72℃30 秒間→94℃30 秒間→67.3℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→66.6℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→65.9℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→65.2℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→64.5℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→63.8℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→63.1℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→62.4℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→61.7℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→61.0℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→60.3℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→59.6℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→58.9℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→58.2℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→57.5℃30 秒間→72℃1 分間→94℃30 秒間→56.8℃30 秒間→72℃1 分間の後、94℃30 秒間→56℃30 秒間→72℃1 分間の工程を 23 回行なった。

#### 【0169】

（結果）

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 1 に示す。図 1 中の左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、同図中左端レーンから 2 レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である Russia6 について上記 AFLP の検出を行なった結果を示し、同図中左端レーンから 3 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の H.E.S.4 について上記 AFLP の検出を行なった結果を示す。その他のレーンについては、Russia6 と H.E.S.4 の交配から育成した組み換え近交系統（RI 系統）RHI 集団について上記 AFLP の検出を行なった結果を示している。

#### 【0170】

図 1 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Russia6 型）と罹病性型（H.E.S.4 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Russia6 型）のものが約 128 bp（図中矢印で示す）であり、罹病性型（H.E.S.4 型）のものは 0 bp である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型（Russia6 型）は、約 128 bp の増幅断片が得られるのに対して、罹病性型（H.E.S.4 型）は約 128 bp の増幅断片が得られないということである。よって、試験対象植物について上記 AFLP の検出操作を行ない、約 128 bp の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 4 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0171】

〔実施例 3：遺伝マーカー「FMgcgEatc530」の検出〕

（方法）

方法については、配列番号 10 に示される塩基配列を有する EcoRI のセレクトティブプライマー、および配列番号 9 に示される塩基配列を有する MseI のセレクトティブプライマーを用いて増幅反応（本増幅）を行なった。

イマーを用いて増幅反応（本増幅）を行なう以外は、上記実施例 2 に示した方法と同様にした。

#### 【0172】

（結果）

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 2 に示す。図 2 中の左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、同図中左端レーンから 2 レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である Russia 6 について上記 AFLP の検出を行なった結果を示し、同図中左端レーンから 3 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の H.E.S. 4 について上記 AFLP の検出を行なった結果を示す。その他のレーンについては、Russia 6 と H.E.S. 4 の交配から育成した組み換え近交系統（R I 系統）R H I 集団について上記 AFLP の検出を行なった結果を示している。

#### 【0173】

図 2 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Russia 6 型）と罹病性型（H.E.S. 4 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Russia 6 型）のものが 0 b p であり、罹病性型（H.E.S. 4 型）のものは約 530 b p（図中矢印で示す）である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型（Russia 6 型）は、約 530 b p の増幅断片が得られないのに対して、罹病性型（H.E.S. 4 型）は約 530 b p の増幅断片が得られるということである。よって、試験対象植物について上記 AFLP の検出操作を行ない、約 530 b p の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 4 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0174】

〔実施例 4：遺伝マーカー「FXLRRfor\_XLRRrev119」の検出〕

（方法）

配列番号 1 および 2 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃5 分間の後、94℃1 分間→45℃1 分間→72℃2 分間を 45 回行なった後、72℃7 分間とした。

#### 【0175】

（結果）

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 3 に示す。図 3 中の左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、同図中左端レーンから 2 レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である Harbin 2-row についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから 3 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の Turkey 6 の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、Harbin 2-row（抵抗性）と Turkey 6（罹病性）の交配から育成した組み換え近交系統（R I 系統）R I 2 集団についての増幅断片の結果を示している。

#### 【0176】

図 3 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）と罹病性型（Turkey 6 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Harbin 2-row 型）のものが 0 b p であり、罹病性型（Turkey 6 型）のものは約 119 b p（図中矢印で示す）である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）は約 119 b p の増幅断片が得られないのに対して、罹病性型（Turkey 6 型）は約 119 b p の増幅断片が得られるということである。よって、試験対象植物について上記 AFLP の検出操作を行ない、約 119 b p の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 2 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0177】

〔実施例 5：遺伝マーカー「FmacgEcgt288」の検出〕

## (方法)

方法については、配列番号12に示される塩基配列を有するEcoRIのセレクトイブプライマー、および配列番号11に示される塩基配列を有するMseIのセレクトイブプライマーを用いて増幅反応（本増幅）を行なう以外は、上記実施例2に示した方法と同様にした。

## 【0178】

## (結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図4に示す。図4中の左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、同図中左端レーンから2レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種であるHarbin 2-rowについての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから3レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種のTurkey 6の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、Harbin 2-row（抵抗性）とTurkey 6（罹病性）の交配から育成した組み換え近交系統（RI系統）RI2集団についての増幅断片の結果を示している。

## 【0179】

図4の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）と罹病性型（Turkey 6型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Harbin 2-row 型）のものが0bpであり、罹病性型（Turkey 6型）のものは約288bp（図中矢印で示す）である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）は約288bpの増幅断片が得られないのに対して、罹病性型（Turkey 6型）は約288bpの増幅断片が得られるということである。よって、試験対象植物について上記AFLPの検出操作を行ない、約288bpの増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

## 【0180】

〔実施例6：遺伝マーカー「HVM67」の検出〕

## (方法)

配列番号13および14に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノムDNAを鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃3分間の後、94℃1分間→64℃1分間（1サイクルごとに1℃低下させる）→72℃1分間を10回行なった後、94℃1分間→55℃1分間→72℃1分間を30回行なった後、72℃5分間とした。

## 【0181】

## (結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図5に示す。図5中の左端レーンはサイズマーカーを示し、同図中左端レーンから2レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種であるHarbin 2-rowについての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから3レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種のTurkey 6の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、Harbin 2-row（抵抗性）とTurkey 6（罹病性）の交配から育成した組み換え近交系統（RI系統）RI2集団についての増幅断片の結果を示している。

## 【0182】

図5の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row型）と罹病性型（Turkey 6型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Harbin 2-row型）のものが160bp（図中矢印で示す）であり、罹病性型（Turkey 6型）のものは約140bp（図中白抜き矢印で示す）である。よって、試験対象植物について上記の検出操作を行ない、約160bpあるいは約140bpの増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

子型を有するかを判別できる。

【0183】

〔実施例 7：遺伝マーカー「FMataEagc408」の検出〕

(方法)

方法については、配列番号 24 に示される塩基配列を有する E c o R I のセレクトティブプライマー、および配列番号 23 に示される塩基配列を有する M s e I のセレクトティブプライマーを用いて増幅反応（本増幅）を行なう以外は、上記実施例 2 に示した方法と同様にした。

【0184】

(結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 6 に示す。図 6 中の左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、同図中左端レーンから 2 レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である Harbin 2-row についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから 3 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の Turkey 6 の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、Harbin 2-row（抵抗性）と Turkey 6（罹病性）の交配から育成した組み換え近交系統（R I 系統）R I 2 集団についての増幅断片の結果を示している。

【0185】

図 6 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）と罹病性型（Turkey 6 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Harbin 2-row 型）のものが 0 b p であり、罹病性型（Turkey 6 型）のものは約 408 b p（図中矢印で示す）である。換言すれば、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）は約 408 b p の増幅断片が得られないのに対して、罹病性型（Turkey 6 型）は約 408 p の増幅断片が得られるということである。よって、試験対象植物について上記 A F L P の検出操作を行ない、約 408 b p の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 6 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

【0186】

〔実施例 8：遺伝マーカー「HVM11」の検出〕

(方法)

配列番号 25 および 26 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃3 分間の後、94℃1 分間→64℃1 分間（1 サイクルごとに 1℃低下させる）→72℃1 分間を 10 回行なった後、94℃1 分間→55℃1 分間→72℃1 分間を 30 回行なった後、72℃5 分間とした。

【0187】

(結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 7 に示す。図 7 中右端レーンは赤かび病抵抗性オオムギ品種である Harbin 2-row についての増幅断片の結果を示し、同図中右端レーンから 2 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の Turkey 6 の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、Harbin 2-row（抵抗性）と Turkey 6（罹病性）の交配から育成した組み換え近交系統（R I 系統）R I 2 集団についての増幅断片の結果を示している。

【0188】

図 7 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（Harbin 2-row 型）と罹病性型（Turkey 6 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（Harbin 2-row 型）のものが 144 b p（図中矢印で示す）であり、罹病性型（Turkey 6 型）のものは罹病性型のものは約 100 b p - 160 b p（図中白抜き矢印で示す）に増幅断片が見られる。よって、試験対象植物について上記検出操作を行な

い、約 144 bp あるいは約 100 bp - 160 bp の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 6 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0189】

〔実施例 9：遺伝マーカー「Bmag125」の検出〕

(方法)

配列番号 3 および 4 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃3分間、55℃1分間、72℃1分間の後、94℃1分間→55℃1分間→72℃1分間を30回行なった後、72℃5分間とした。

#### 【0190】

(結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 8 に示す。図 8 中左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、左端レーンから 2 レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である、はるな二条についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから 3 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の H 6 0 2 の増幅断片の結果を示し、4 レーン目はこれらの F 1 の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、はるな二条（抵抗性）と H 6 0 2 （罹病性）の交配から育成した倍加半数体系統（DH 系統）DHHS についての増幅断片の結果を示している。

#### 【0191】

図 8 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（はるな二条型）と罹病性型（H 6 0 2 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（はるな二条型）のものが 142 bp（図中矢印で示す）であり、罹病性型（H 6 0 2 型）のものは罹病性型のものは約 134 bp（図中白抜き矢印で示す）に増幅断片が見られる。よって、試験対象植物について上記の検出操作を行ない、約 142 bp あるいは約 134 bp の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 2 H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0192】

〔実施例 10：遺伝マーカー「k04002」の検出〕

(方法)

配列番号 5 および 6 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃2分間の後、94℃30秒間→65℃30秒間（1サイクルごとに1℃低下させる）→72℃2分間を5回行なった後、94℃30秒間→60℃30秒間→72℃2分間を35回行なった後、72℃7分間とした。

#### 【0193】

(結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 9 に示す。図 9 中左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、左端レーンから 2 レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である、はるな二条についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから 3 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の H 6 0 2 の増幅断片の結果を示し、4 レーン目はこれらの F 1 の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、はるな二条（抵抗性）と H 6 0 2 （罹病性）の交配から育成した倍加半数体系統（DH 系統）DHHS についての増幅断片の結果を示している。

#### 【0194】

図 9 の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（はるな二条型）と罹病性型（H 6 0 2 型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（はるな二条型）のものが約 350 bp（図中矢印で示す）であり、罹病性型（H 6 0 2 型）のものは罹病性型のものは約 440 bp（図中白抜き矢印で示す）に

増幅断片が見られる。よって、試験対象植物について上記検出操作を行ない、約 350 bp あるいは約 440 bp の増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該 2H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0195】

〔実施例 11：遺伝マーカー「k05042」の検出〕

(方法)

配列番号 15 および 16 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃2分間の後、94℃30秒間→65℃30秒間（1サイクルごとに1℃低下させる）→72℃2分間を5回行なった後、94℃30秒間→60℃30秒間→72℃2分間を35回行なった後、72℃7分間とした。

#### 【0196】

上記増幅産物を 1.6 U の H a p I I （タカラバイオ社製）を用いて、37℃15時間制限酵素消化を行なった。

#### 【0197】

(結果)

上記制限酵素消化後の増幅断片について電気泳動を行なった結果を図 10 に示す。図 10 中左端レーンは赤かび病抵抗性オオムギ品種である、はるな二条についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから 2 レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種の H 6 0 2 の増幅断片の結果を示し、3 レーン目はこれらの F 1 の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、はるな二条と H 6 0 2 の交配から育成した倍加半数体系統（DH 系統）DH H S についての増幅断片の結果を示している。

#### 【0198】

当該遺伝マーカーは、既述の通り CAP S マーカーである。よって、制限酵素（H a p I I）の消化パターンが異なる。図 10 の結果によれば、上記操作による消化断片には、赤かび病に対してはるな二条型と抵抗性型 H 6 0 2 型が存在し、それぞれの消化断片の断片長は、はるな二条型のものが約 150 bp、約 350 bp、約 500 bp であり、H 6 0 2 型のは約 300 bp、約 340 bp、約 360 bp に増幅断片が見られる。なお、H 6 0 2 型の約 340 bp、約 360 bp の増幅断片は電気泳動の解像度が低い場合重複して見える場合がある。よって、試験対象植物について上記操作を行ない、消化断片のパターンを指標にすれば、対象植物個体が当該 4H 染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【0199】

ただし既述の通り、本遺伝マーカーが連鎖する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座は、赤かび病罹病性型品種である H 6 0 2 が有する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座である。よって、本遺伝マーカーを検出する場合は、はるな二条型が罹病性型となり、H 6 0 2 型が抵抗性型となる。

#### 【0200】

〔実施例 12：遺伝マーカー「k03289」の検出〕

(方法)

配列番号 17 および 18 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃2分間の後、94℃30秒間→65℃30秒間（1サイクルごとに1℃低下させる）→72℃2分間を5回行なった後、94℃30秒間→60℃30秒間→72℃2分間を35回行なった後、72℃7分間とした。

#### 【0201】

上記増幅産物を 1.6 U の S a c I I （タカラバイオ社製）を用いて、37℃15時間制限酵素消化を行なった。



## 【0202】

(結果)

上記制限酵素消化後の増幅断片について電気泳動を行なった結果を図11に示す。図11中右端レーンは、はるな二条についての増幅断片の結果を示し、同図中右端レーンから2レーン目はH602の増幅断片の結果を示し、3レーン目はこれらのF1の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、はるな二条(抵抗性)とH602(罹病性)の交配から育成した倍加半数体系統(DH系統)DHHSについての増幅断片の結果を示している。

## 【0203】

当該遺伝マーカーは、既述の通りCAPSマーカーである。よって、制限酵素(SacI)の消化パターンが異なる。図11の結果によれば、上記操作による消化断片には、赤かび病に対してはるな二条型とH602型が存在し、それぞれの消化断片の断片長は、はるな二条型のものが約250bp、約250bpであり、H602型のものは約500bpに増幅断片が見られる。よって、試験対象植物について上記操作を行ない、消化断片のパターンを指標にすれば、対象植物個体が当該4H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

## 【0204】

ただし、既述の通り、本遺伝マーカーが連鎖する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座は、赤かび病罹病性型品種であるH602が有する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座である。よって、本遺伝マーカーを検出する場合は、はるな二条型が罹病性型となり、H602型が抵抗性型となる。

## 【0205】

[実施例13：遺伝マーカー「HvLOX」の検出]

(方法)

配列番号19および20に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノムDNAを鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃3分間、58℃1分間、72℃1分間の後、94℃30秒間→58℃30秒間→72℃30秒間を30回行なった後、72℃5分間とした。

## 【0206】

(結果)

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図12に示す。図12中左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、左端レーンから2レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である、はるな二条についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから3レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種のH602の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、はるな二条(抵抗性)とH602(罹病性)の交配から育成した倍加半数体系統(DH系統)DHHSについての増幅断片の結果を示している。

## 【0207】

図12の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型(はるな二条型)と罹病性型(H602型)が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型(はるな二条型)のものが155bp(図中矢印で示す)であり、罹病性型(H602型)のものは約157bp(図中白抜き矢印で示す)に増幅断片が見られる。よって、試験対象植物について上記の検出操作を行ない、約155bpあるいは約157bpの増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該5H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

## 【0208】

[実施例14：遺伝マーカー「k00835」の検出]

(方法)



配列番号 21 および 22 に示される塩基配列を有するプライマーを用い、試験対象オオムギのゲノム DNA を鋳型として、増幅反応を行なった。反応サイクルは、94℃2分間の後、94℃30秒間→65℃30秒間（1サイクルごとに1℃低下させる）→72℃2分間を5回行なった後、94℃30秒間→60℃30秒間→72℃2分間を35回行なった後、72℃7分間とした。

#### 【0209】

（結果）

上記増幅反応によって得られた増幅断片について電気泳動を行なった結果を図13に示す。図13中左端レーンおよび右端レーンはサイズマーカーを示し、左端レーンから2レーン目は赤かび病抵抗性オオムギ品種である、はるな二条についての増幅断片の結果を示し、同図中左端レーンから3レーン目は赤かび病罹病性オオムギ品種のH602の増幅断片の結果を示し、4レーン目はこれらのF1の増幅断片の結果を示す。その他のレーンについては、はるな二条（抵抗性）とH602（罹病性）の交配から育成した倍加半数体系（DH系統）DHHSについての増幅断片の結果を示している。

#### 【0210】

図13の結果によれば、上記操作によって増幅される増幅断片には、赤かび病に対して抵抗性型（はるな二条型）と罹病性型（H602型）が存在し、それぞれの増幅断片の断片長は、抵抗性型（はるな二条型）のものが約900bp（図中矢印で示す）であり、罹病性型（H602型）のものは約880bp（図中白抜き矢印で示す）に増幅断片が見られる。よって、試験対象植物について上記の検出操作を行ない、約900bpあるいは約880bpの増幅断片の有無を指標にすれば、対象植物個体が当該5H染色体に座乗する赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の対立遺伝子について、抵抗性の遺伝子型を有するか、罹病性の遺伝子型を有するかを判別できる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0211】

本発明によれば、オオムギの赤かび病抵抗性のメカニズムの解明・赤かび病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の生産・赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座の有無の判断・赤かび病抵抗性植物（例えばオオムギをはじめとするムギ類）の判別等を行なうことが可能となる。よって、これまで赤カビが原因で収穫量の低下・品質の低下・人体被害等を被っていたオオムギをはじめとする植物に対して適用すればその病害を減少させることができる。従って、作物生産をはじめとする農業全般に利用可能である。さらには、オオムギ等を原料とする食品産業においても有効である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0212】

【図1】実施例2において遺伝マーカー「MMtgaEatc128」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図2】実施例3において遺伝マーカー「FMgcgEatc530」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図3】実施例4において遺伝マーカー「FXLRRfor\_XLRRrev119」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図4】実施例5において遺伝マーカー「FmacgEcgt288」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図5】実施例6において遺伝マーカー「HVM67」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図6】実施例7において遺伝マーカー「FMataEagc408」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図7】実施例8において遺伝マーカー「HVM11」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図8】実施例9において遺伝マーカー「Bmag125」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図 9】実施例 1 0 において遺伝マーカー「k04002」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図 1 0】実施例 1 1 において遺伝マーカー「k05042」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図 1 1】実施例 1 2 において遺伝マーカー「k03289」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図 1 2】実施例 1 3 において遺伝マーカー「HvLOX」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図 1 3】実施例 1 4 において遺伝マーカー「k 00835」の多型検出を行なった結果を示す電気泳動図である。

【図 1 4】遺伝マーカー「k05042」における、はるな二条と H 6 0 2 間の S N P、および S N P 周辺の塩基配列を示す図である。

【図 1 5】遺伝マーカー「k03289」における、はるな二条と H 6 0 2 間の S N P、および S N P 周辺の塩基配列を示す図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> DNA markers that linked to genes associated with Fusarium head blight, and use thereof

<130> A181P162

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

ccgttgaca ggaaggag

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

cccatagacc ggactgtt

18

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

aattagcgag aacaaaatca c

21

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 4

agataacgat gcaccacc

18

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 5

gacacaggac ctgaagcaca

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

cggcaggctc tactatgagg

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7  
gatgagtcct gagtaaadc

19

<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8  
gactgcgtac caattctga

19

<210> 9  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 9  
gatgagtcct gagtaaadc

19

<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10  
gactgcgtac caattcgcg

19

<210> 11  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

gatgagtcct gagtaaacg

19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

gactgcgtac caattccgt

19

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gtcgggctcc attgctct

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

ccggtaccca gtgacgac

18

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

atacatgcat gccattgtgg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

atccatccac tgtttgaggg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

tgctctgcat ttcattcagc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

cagcgttaca ggcatttctca

20

<210> 19

<211> 20



<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 19  
cagcatatcc atctgatctg

20

<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 20  
cacccttatt tattgcctta a

21

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 21  
tccatgttcc cagctacaca

20

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 22  
aggaacacat tggttctggc

20

<210> 23  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 23  
gatgagtcct gagtaaata 19

<210> 24  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 24  
gactgcgtac caattcagc 19

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 25  
ccggtcgggtg cagaagag 18

<210> 26  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 26  
aaatgaaagc taaatgggcg atat 24

<210> 27  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 27  
gacgatgagt cctgag 16

<210> 28  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 28  
tactcaggac tcat 14

<210> 29  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 29  
ctcgtagact gcgtacc 17

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 30  
aatggtacg cagtctac

18

<210> 31  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 31  
gatgagtcct gagtaa

16

<210> 32  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 32  
gactgcgtac caattc

16

<210> 33  
<211> 251  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<220>  
<221> n  
<222> (7)

<220>  
<221> n  
<222> (17)

<220>  
<221> n  
<222> (29)

<220>  
<221> n  
<222> (47)

<220>  
<221> n  
<222> (98)

<400> 33  
ttacagntat aataggnggt ttcagttgnt agtgctttta caacagnaat agaagggttt 60  
cactgtgaat ccacaacata tcaagtggta cacatagnac catgtcattc atacatgcat 120  
gccattgtgg ggagaagcac aggtgggtgg gaaattccct ctctcaaag agaagatgtg 180  
gctatgcctt gagcatccgc aggtagtctt cgattatgga catggctgac gagcgtacc 240  
cagagccgaa a 251

<210> 34  
<211> 251  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<220>  
<221> n  
<222> (35)

<220>  
<221> n  
<222> (37)

<400> 34  
tgttgggaca tggagctgca gctcttgca aaccnancct ctctgctctg catttcattc 60  
agcaataaa ctcattggcct tgctgctgct tccctaaaac cttaaagacta gcaactactg 120  
gtacacgcaa cctcctcctc catctctagc tatgaacaag gtaaattttac ccaccttttc 180  
tatcacaaaa aaaatatgaa caccaagccg aatcacgact gagaatttta cacaatgata 240  
atcgctcagc c 251

<210> 35  
<211> 249  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<220>  
<221> n  
<222> (19)

<400> 35  
acaagcgcac attttaatnc ttattatcgc tcactcactc gaagagttgc gtattaaaat 60  
tacactaaaa acctaacagc tcagctagct aagctcctcc tcaaccatca acatgggaac 120  
aatccatgtt cccagctaca catatgatac atacatcagc taagctcttc tagcaacca 180  
accaatgacc ctggttggat tcagaagttg ctcttgctcg tcgaaggctt cgacctcttg 240  
ctgttgagc 249

<210> 36  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 36  
gaaaacatgc aggtgaactc a 21

<210> 37  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 37  
gaaaacatgc cggagaactc a 21

<210> 38  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 38  
gcgggcgccg cgggtcagc g 21

<210> 39  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 39  
gcgggcgccg tgggtcagc g 21

<210> 40  
<211> 519  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<400> 40  
agcactccag tgttggggca ttgtcgactt cagtgcacgg ccatctcaca acaagcagca 60  
accgcttgat gggaacatgt ttattaacta tatcgtcagg aagtgtgtg accttggcat 120  
tcagatgaac aagacagcat gttttgtgca tctatcagaa atgtcagtgc tatcggatcc 180  
acaccaactg cacgaggagc tgaacaaagc aaagcaggct gcgggtgaaga agaaccagaa 240  
gctgcaactc ctcttctgcc cgatgtctga gcagcatcat ggggtacaaga cactgaagct 300  
gatctgcgag acgcagctgg ggatccaaac ccagtgtttc ttgagccacc tcgcaaacia 360  
aaccaggggc caggaccagt acatgtccaa tcttgctctc aagatcaacg gcaagctcgg 420

gggcatcaac acccagctcc aggacaagct cccactggac aacggtgttc cttacatggt 480  
cataggcgca gacgtgaacc acccatcacc tgggaatgg 519

<210> 41  
<211> 538  
<212> DNA  
<213> Hordeum vulgare

<220>  
<221> n  
<222> (41)

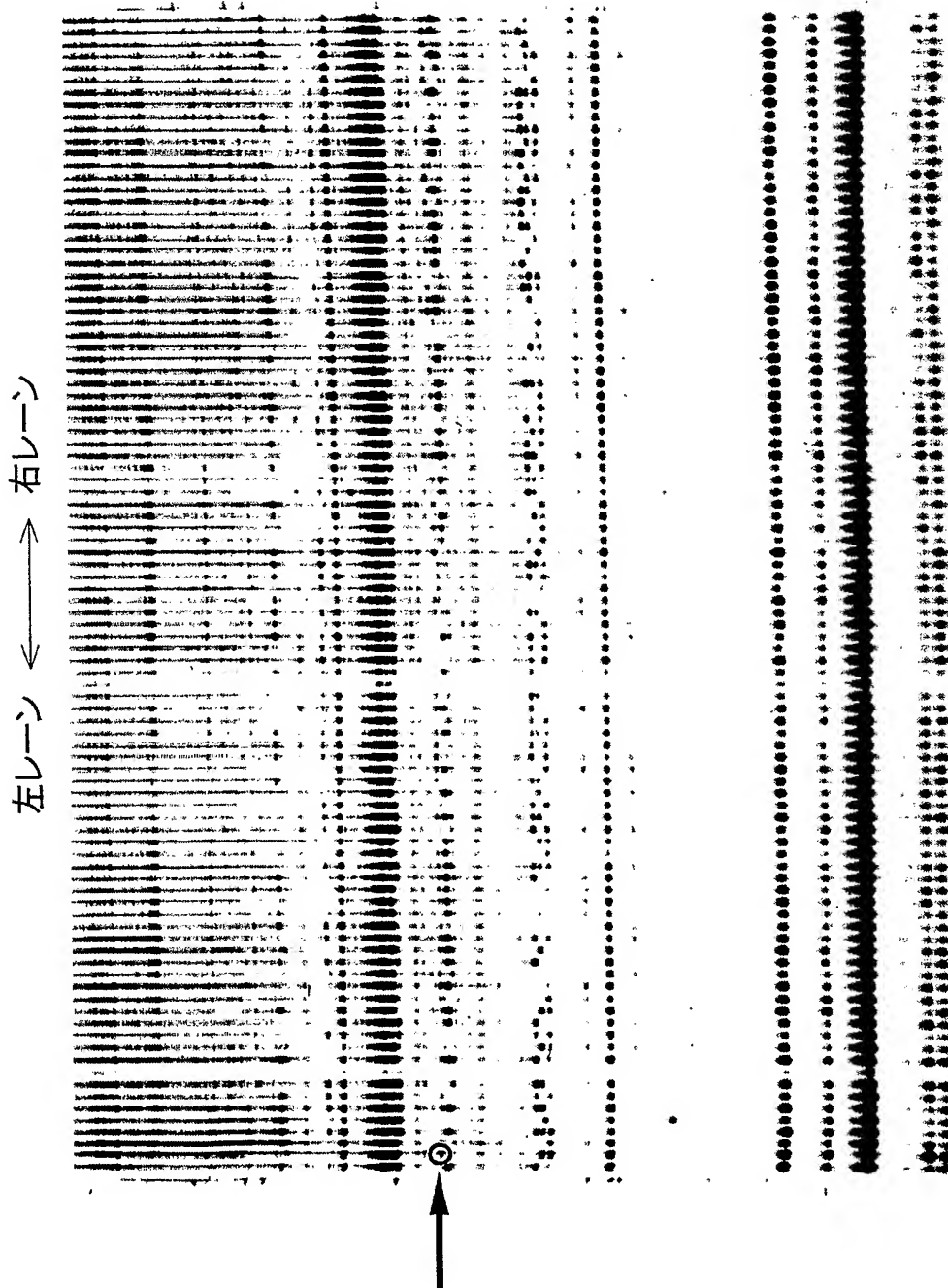
<400> 41  
agtcgctcgt tgtggctttg catatcatca gactggcaag nggccaggca accacataac 60  
tatagtataa aagacacaga cctgaagcac acgcacaatg acagaaccag caatacgttc 120  
caagttcaaa gttcagacca tacgaaacag ttcggagtac atgttctacc ggaccaagtt 180  
cagaccatat gaagcagtct gtatatatgt tctaccggac caagttcaga ccatatgaag 240  
cagtctgtat atatgttcta ccggaccaag ttcagaccat atgaagcagt ctgtatatat 300  
gttctaccgg accaagacgc taagcggcac cggtgagaag ccggcgtcag atgaagaaca 360  
tgttgtcctg aagatccacg tgcagcgtcg ggaagttgct gaagtcacaa gccccgccg 420  
ctgtggagga ggccgacgac gacgagctgc gcacctgggg ctgggacgcc agcatgccct 480  
catagtagag cctgccgcgg tacgccgcca ggtcggcgta gtagacgggc gtcgccag 538



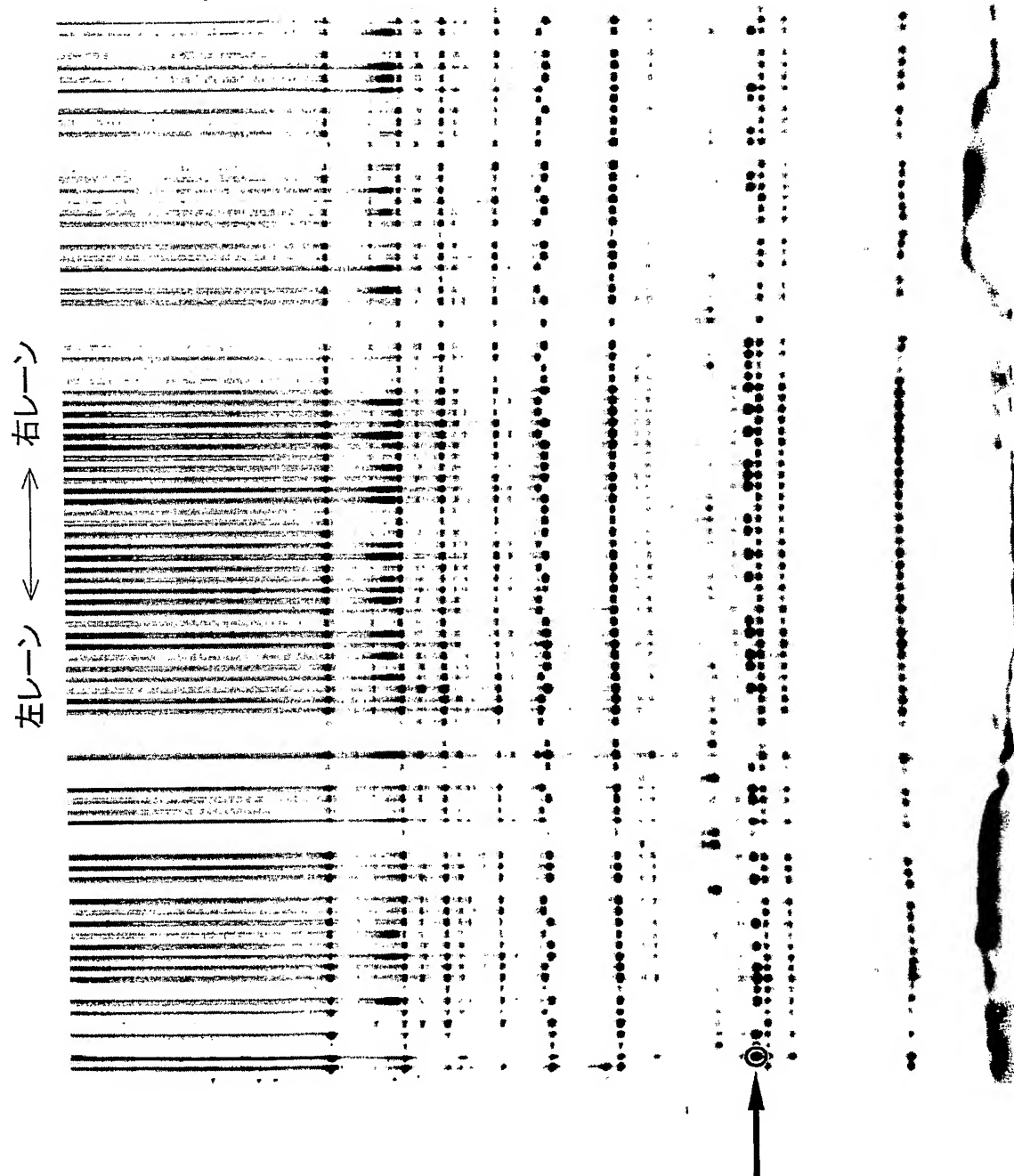
【書類名】 図面  
【図1】

左レーン ← → 右レーン

【図 2】

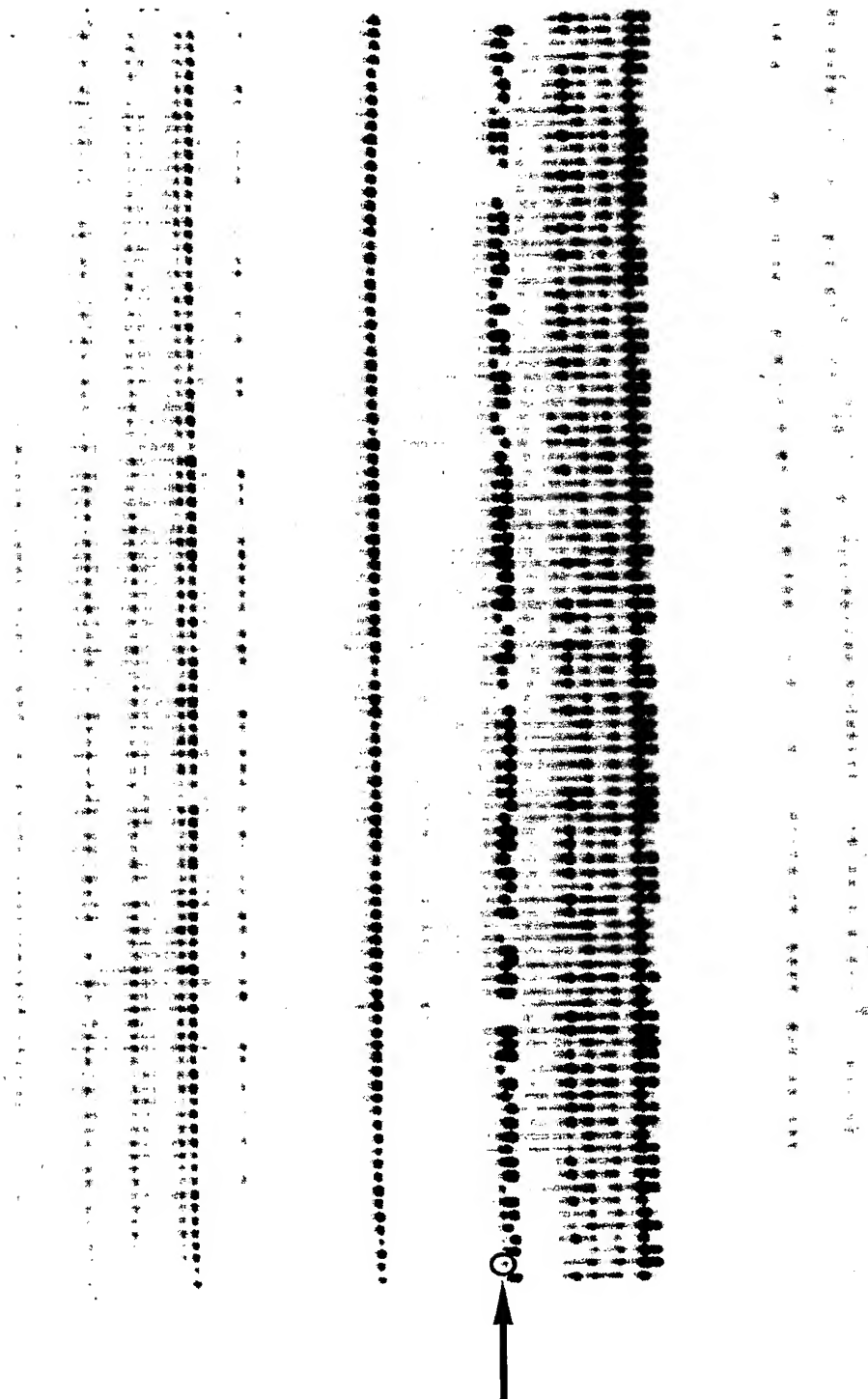


【図 3】

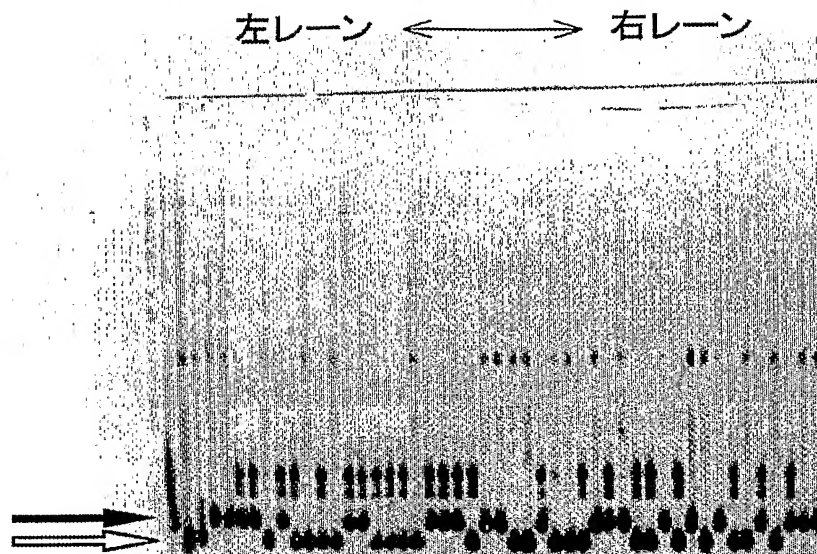


【図 4】

左レーン ← → 右レーン

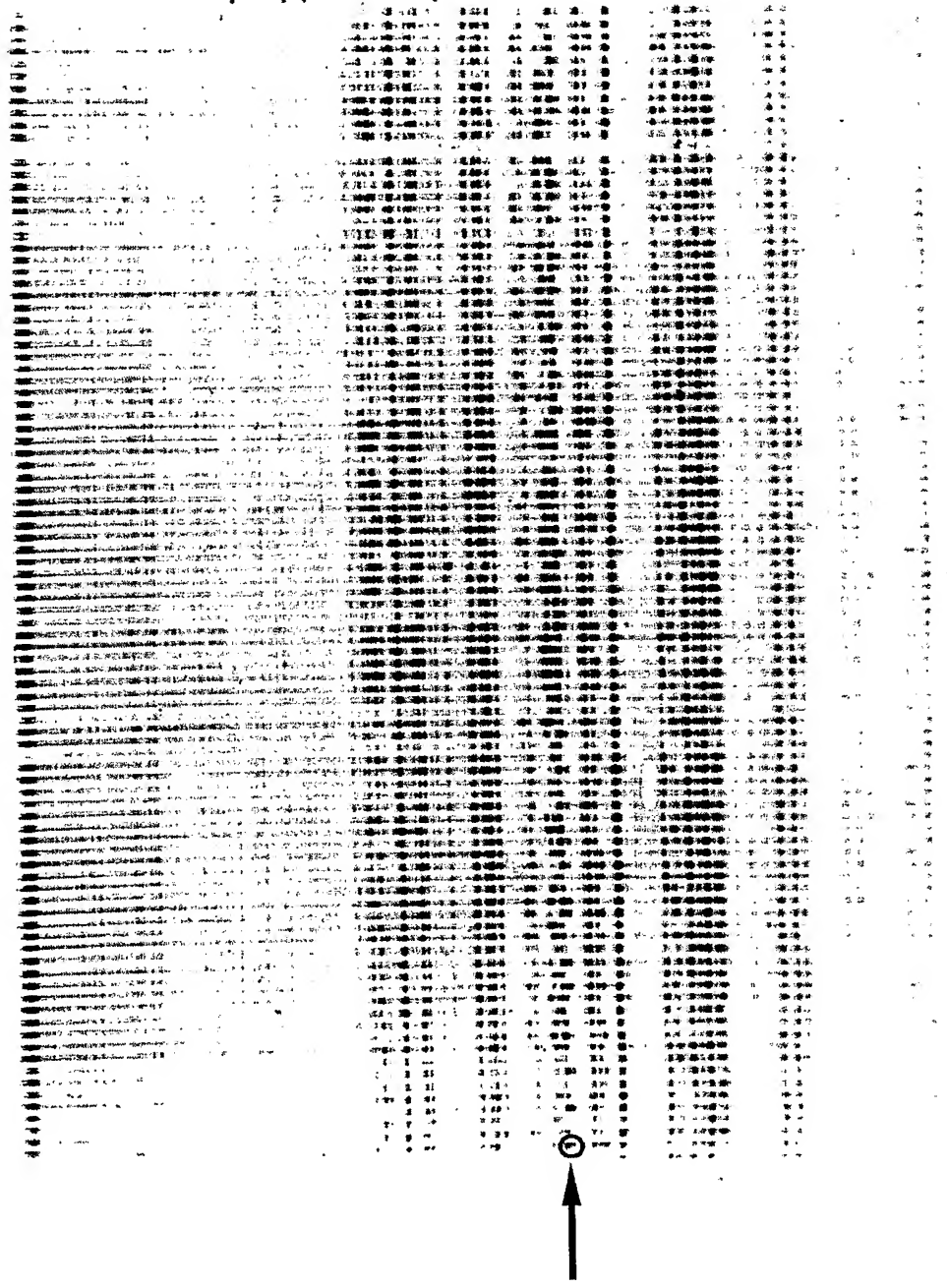


【図 5】



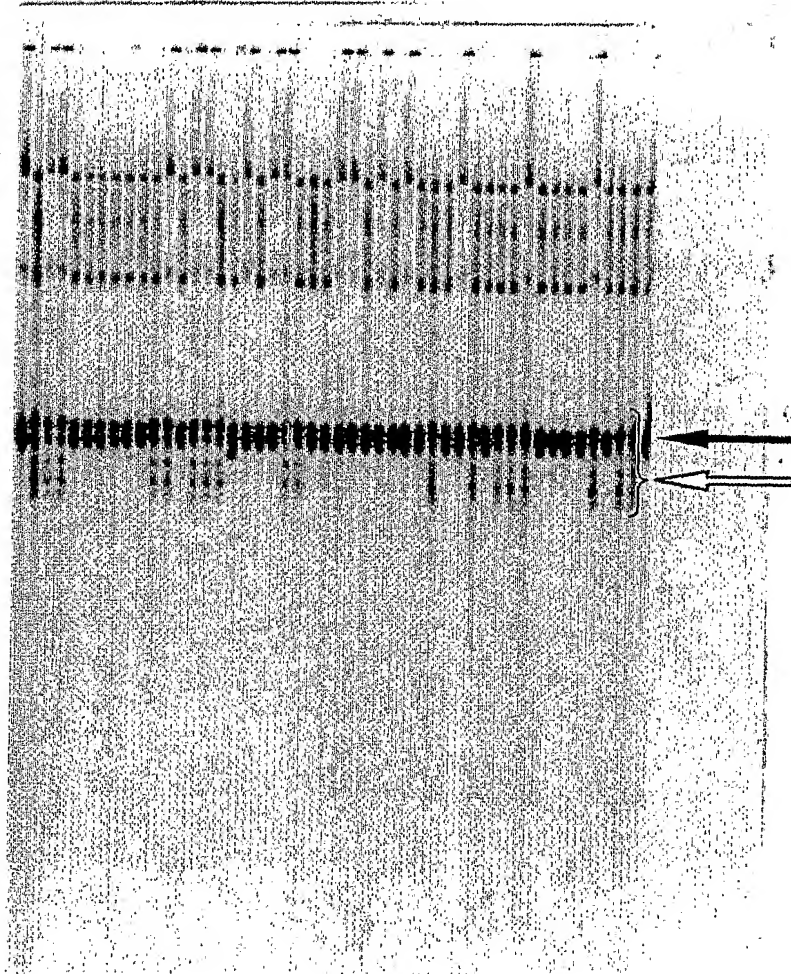
【図 6】

左レーン ← → 右レーン



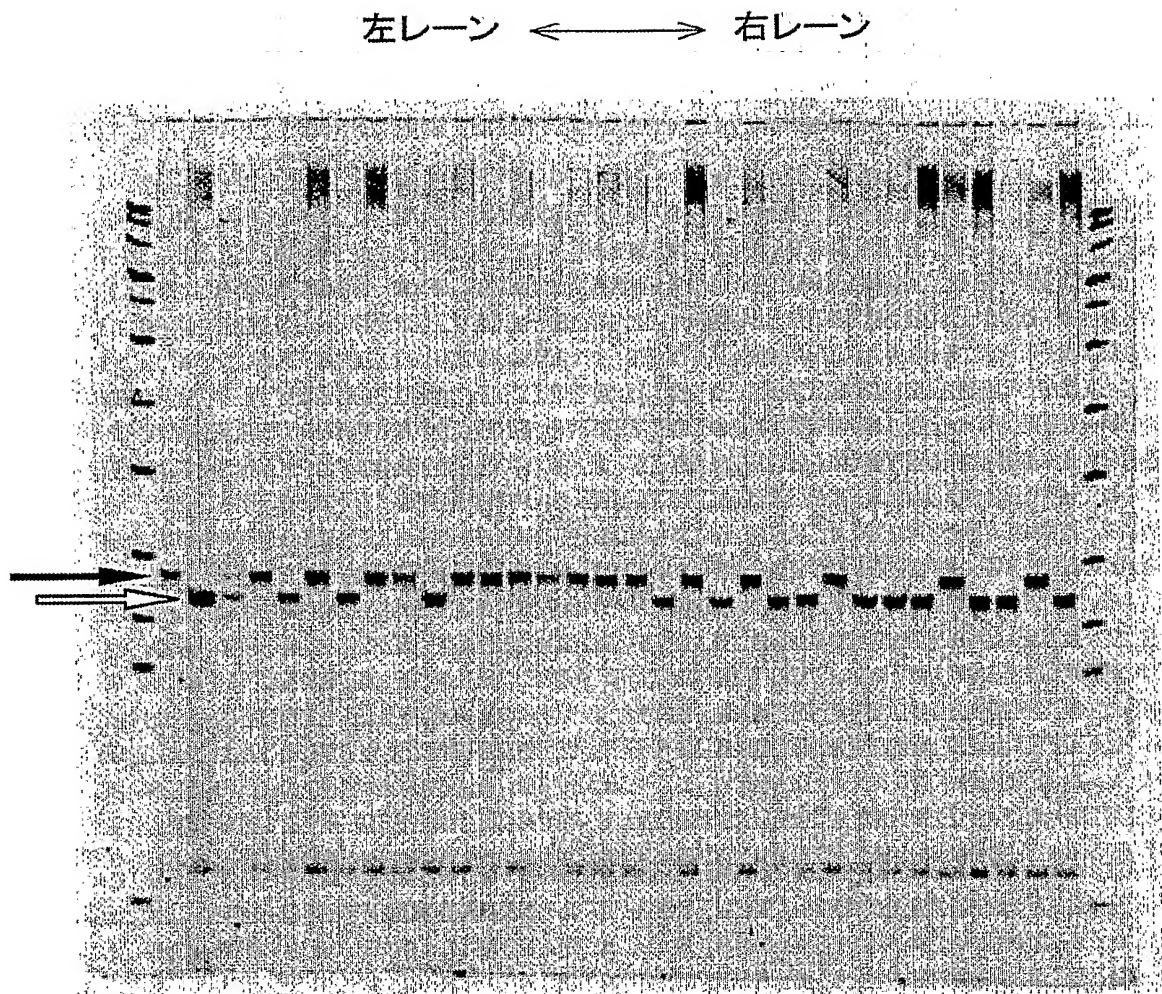
【図 7】

左レーン ← → 右レーン



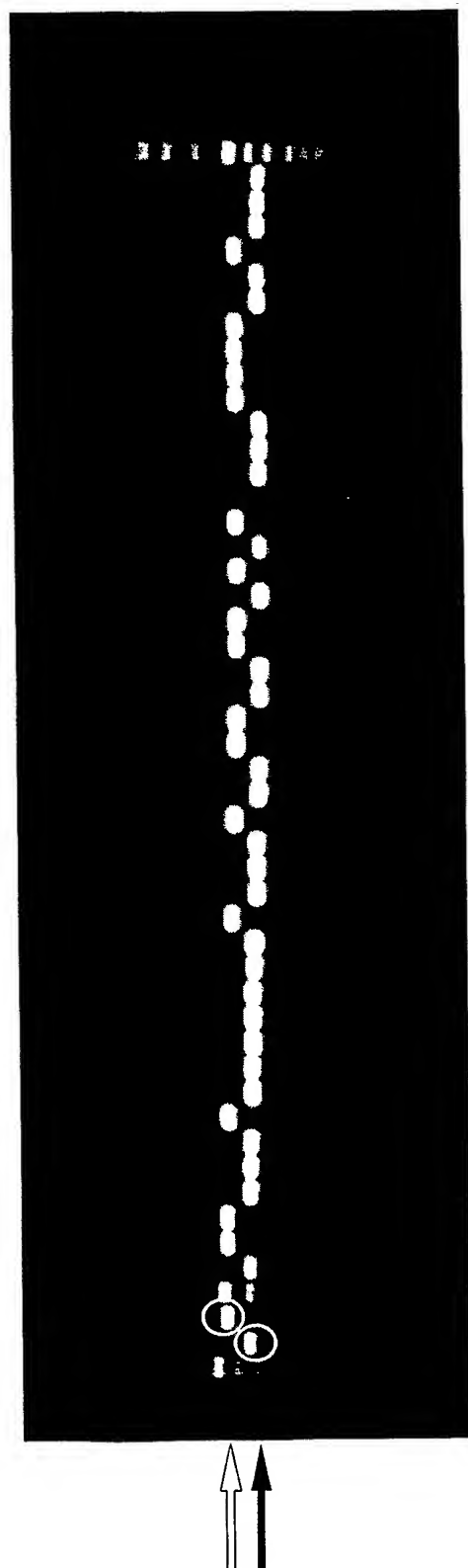


【図 8】



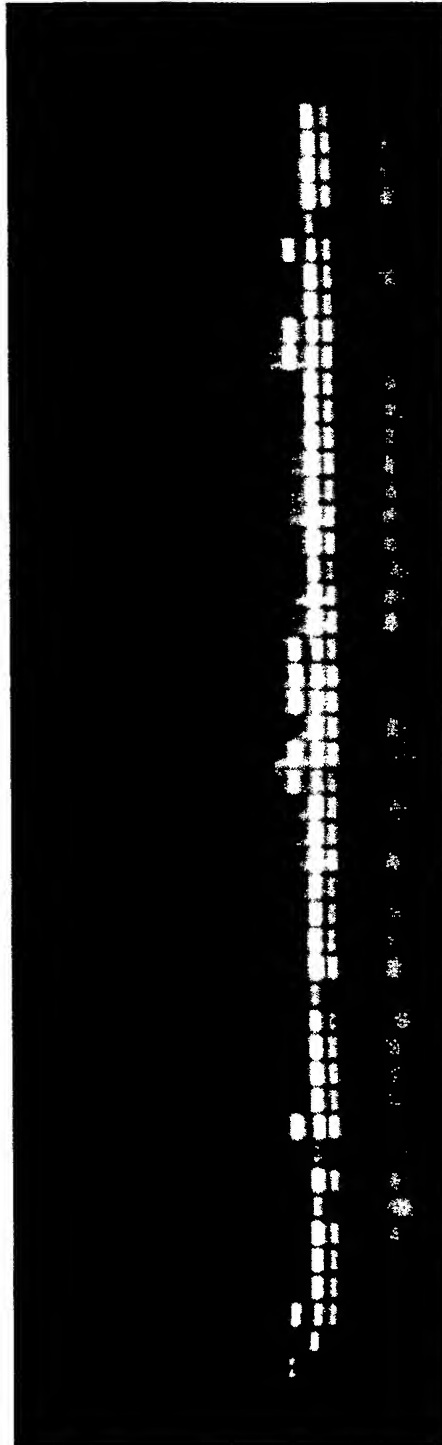
【図 9】

左レーン ← → 右レーン



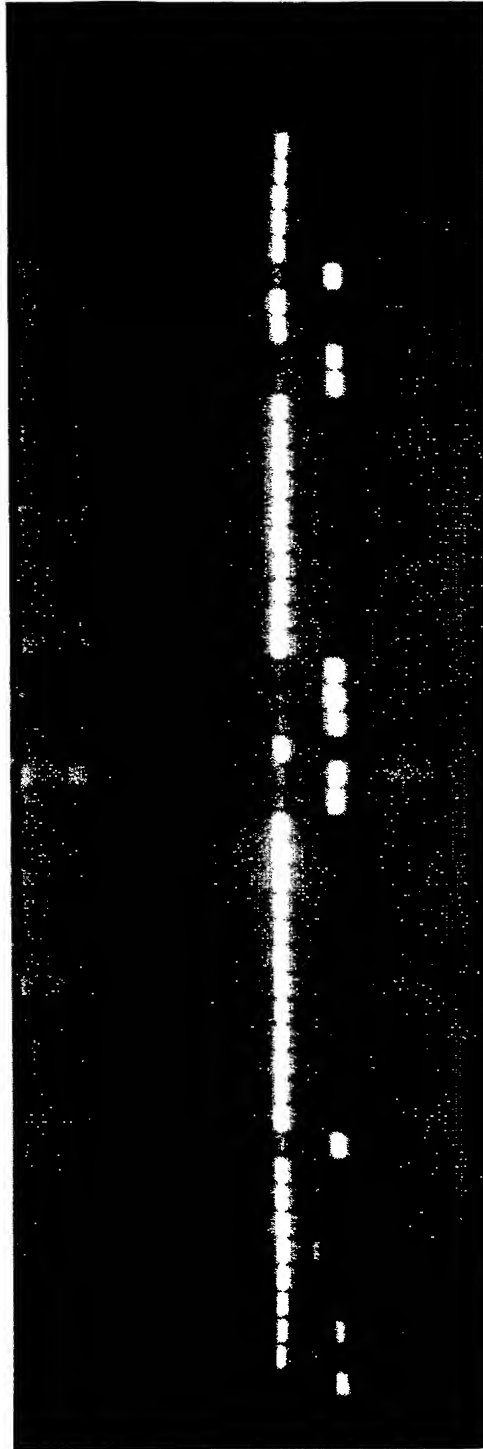
【図 10】

左レーン ← → 右レーン

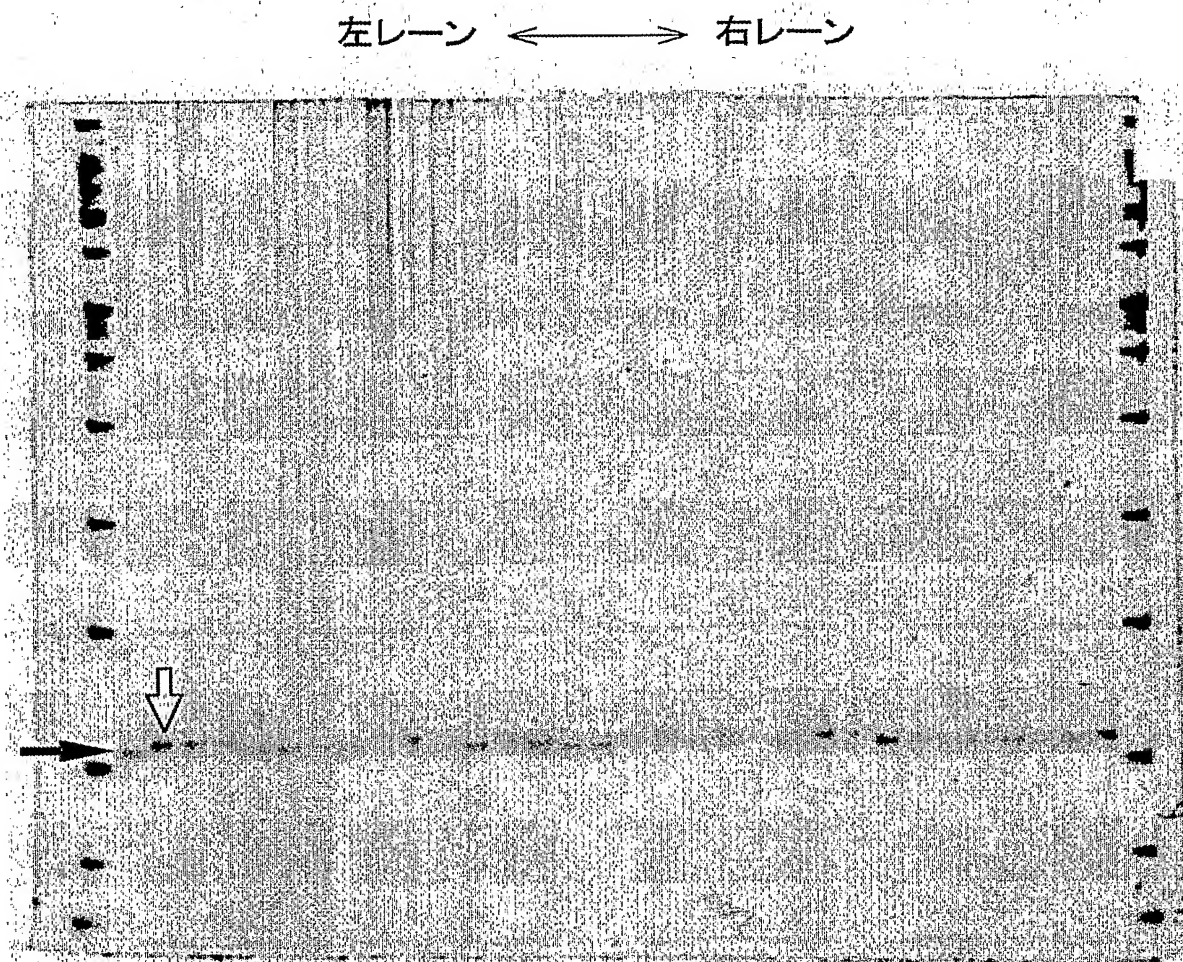


【図 11】

左レーン ← → 右レーン

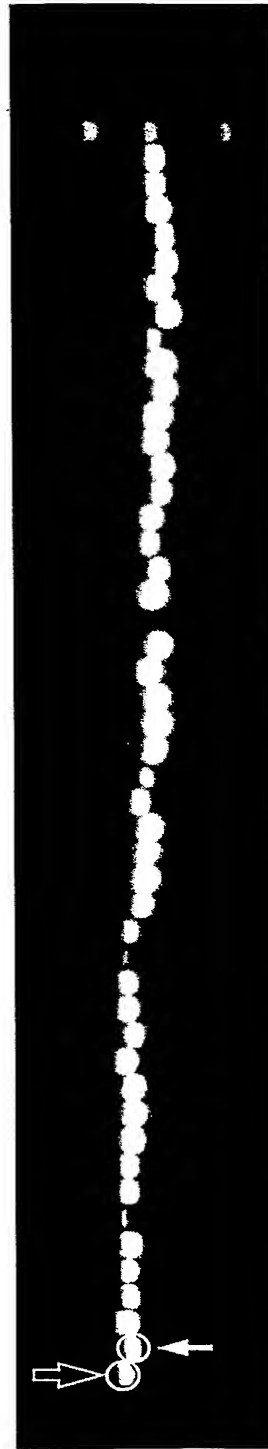


【図 12】



【図 13】

左レーン ← → 右レーン



【図 14】

H602 : GAAACATGC CGGTGA ACTCA  
*HapII*  
 はるな二条 : GAAACATGC AGGTGA ACTCA

【図 15】

H602 : GCGGGCGCCG TGGGT CGAGCG  
 はるな二条 : GCGGGCGCCG CGGGT CGAGCG  
*SacII*



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 オオムギのゲノムDNA中に存在し、かつ赤かび病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーの提供、およびその利用方法の代表例を提供することに関する。

【解決手段】 Russia 6（二条、抵抗性）とH.E.S. 4（六条、罹病性）の交配から育成したR I系統（R H I 集団）、Harbin 2-row（抵抗性）とTurkey 6（罹病性）の交配から育成したR I系統（R I 2 集団）、およびはるな二条（抵抗性）とH 6 0 2（罹病性）の交配から育成したD H系統（D H H S 集団）を材料として、赤かび病抵抗性にかかわるQ T L解析を行なった。その結果、新たにR H I 集団では4 H染色体に、R I 2 集団では2 H、4 H、6 H染色体に、D H H S 集団では2 H、4 H、5 H染色体に、それぞれ1つずつのQ T Lを検出した。さらに当該Q T Lに連鎖する遺伝マーカーを見出した。

【選択図】 なし

特願 2004-270268

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人科学技術振興機構